

SÉRIE A, N° 4273  
N° D'ORDRE 5124

---

# THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES  
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Lise CEDARD née WILLSTAETTER

---

**Première thèse :** Contribution à l'étude de la biosynthèse et du métabolisme  
des œstrogènes naturels.

**Deuxième thèse :** Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 13 juin 1964, devant la Commission d'examen

|                   |                     |
|-------------------|---------------------|
| MM. LEDERER ..... | <i>Président</i>    |
| CLAUSER .....     | } <i>Examineurs</i> |
| BAULIEU .....     |                     |

---

---

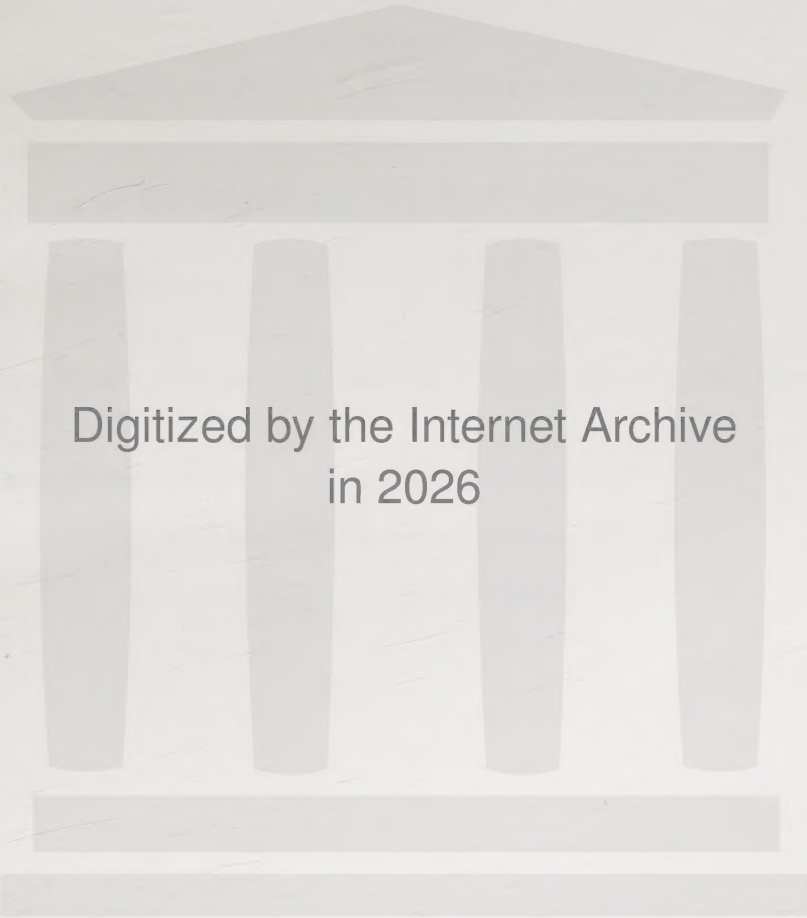
MASSON & C<sup>ie</sup>, ÉDITEURS  
120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN PARIS-VI<sup>e</sup>

---

---

1964





Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41552208\\_0030](https://archive.org/details/IA41552208_0030)



SÉRIE A, N° 4273  
N° D'ORDRE 5124

---

# THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES  
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Lise CEDARD née WILLSTAETTER

---

**Première thèse :** Contribution à l'étude de la biosynthèse et du métabolisme  
des œstrogènes naturels.

**Deuxième thèse :** Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 13 juin 1964, devant la Commission d'examen

|                   |                     |
|-------------------|---------------------|
| MM. LEDERER ..... | <i>Président</i>    |
| CLAUSER .....     | } <i>Examineurs</i> |
| BAULIEU .....     |                     |

---

---

MASSON & C<sup>ie</sup>, ÉDITEURS

120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN PARIS-VI<sup>e</sup>

---

---

1964

---

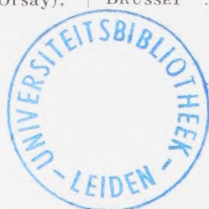
---

# FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

*Doyen*..... M. ZAMANSKY

## PROFESSEURS

|                                 |                                                   |                                  |                                                    |
|---------------------------------|---------------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------------------|
| G. JULIA .....                  | T Analyse supérieure et<br>Algèbre supérieure.    | VASSY .....                      | T Physique de l'atmosph.                           |
| PRENANT .....                   | T Anat. et Histol. comp.                          | DESTOUCHES .....                 | T Théorie physiques.                               |
| GRASSÉ .....                    | T Evol. des êtres organisés.                      | AMIEL .....                      | T Chimie générale.                                 |
| PRÉVOST .....                   | T Chimie organique.                               | HOCART .....                     | T Minéralogie et cristall.                         |
| WYART .....                     | T Minéralogie et cristall.                        | J.-P. MATHIEU .....              | T Physique (Optique).                              |
| TEISSIER .....                  | T Zoologie.                                       | COUTEAUX .....                   | T Cytologie.                                       |
| MANGENOT .....                  | T Biologie végét. (Orsay).                        | MAY .....                        | T Zoologie (Orsay).                                |
| P. AUGER .....                  | T Physique quant. et relat.                       | CHOQUET .....                    | T Théor. des fonctions et<br>topologie.            |
| MONNIER .....                   | T Physiologie générale.                           | FELDMANN .....                   | T Biologie végétale marine.                        |
| PIVETEAU .....                  | T Paléontologie.                                  | GUINIER .....                    | T Phys. des solides (Orsay).                       |
| ROCARD .....                    | T Physique (E. N. S.).                            | JOST .....                       | T Physiologie comparée.                            |
| H. CARTAN .....                 | T Mathématiques (E. N. S.).                       | FORTET .....                     | T Calcul des probabilités<br>et physique mathémat. |
| LAFFITTE .....                  | T Chimie générale.                                | SCHWARTZ .....                   | T Calcul différentiel et in-<br>tégral.            |
| FAVARD .....                    | T Géométrie supérieure.                           | CHOUARD .....                    | T Physiologie végétale.                            |
| COULOMB .....                   | T Physique du Globe.                              | MALAVARD .....                   | T Aviation (Tech. aéronau-<br>tique).              |
| M <sup>lle</sup> COUSIN .....   | T Biol. anim. (S. P. C. N.).                      | BRELOT .....                     | T Calcul différentiel et in-<br>tégral.            |
| CHRÉTIEN .....                  | T Chimie minérale.                                | NORMANT .....                    | T Synthèse organique.                              |
| P. DRACH .....                  | T Zoologie.                                       | BENARD .....                     | T Chimie minérale.                                 |
| KASTLER .....                   | T Physique (E. N. S.).                            | BUVAT .....                      | T Botanique (E. N. S.).                            |
| ÉPHRUSSI .....                  | T Génétique.                                      | DUGUÉ .....                      | T Statistiques mathémat.                           |
| RIVIÈRE .....                   | T Géol. (S.P.C.N.) et sédim.<br>(Orsay).          | SOULAIRAC .....                  | T Psychophysiologie.                               |
| GAUTHERET .....                 | T Biologie végét. (P. C. B.).                     | ULRICH .....                     | T Physiologie végétale ap-<br>pliquée.             |
| R. LUCAS .....                  | T Recherches physiques.                           | MARÉCHAL .....                   | T Optique théor. et appl.                          |
| A. THOMAS .....                 | T Biologie cellulaire.                            | KIRRMANN .....                   | T Théories chimiques.                              |
| ARNULF .....                    | T Optique appliquée.                              | CHADEFAUD .....                  | T Botanique.                                       |
| M. MORAND .....                 | T Enseig. de physique.                            | M <sup>lle</sup> LE BRETON ..... | T Pysiol. de la nutrition.                         |
| SOLEILLET .....                 | T Physique (P. C. B.).                            | LELONG .....                     | T Applie. de l'analyse à la<br>géométrie.          |
| FORTIER .....                   | T Mécán. expér. des fluides.                      | DEVILLERS .....                  | T Anat. et histol. comp.                           |
| DANJON .....                    | T Astronomie.                                     | EHRESMANN .....                  | T Topologie algébrique.                            |
| PETIT .....                     | T Biologie maritime.                              | FRANÇON .....                    | T Physique (S. P. C. N.).                          |
| QUENEY .....                    | T Météorologie et dyna-<br>mique atmosphérique.   | GLANGEAUD .....                  | T Géogr. phys. et géol.                            |
| GALLIEN .....                   | T Embryologie.                                    | GODEMENT .....                   | T Mathématiques (M. P. C.).                        |
| EICHORN .....                   | T Botanique.                                      | PISOT .....                      | T Techniques mathémat. de<br>la Physique.          |
| DE CUGNAC .....                 | T Biol. végét. (S. P. C. N.).                     | E. ROCH .....                    | T Géologie.                                        |
| M <sup>lle</sup> CAUCHOIS ..... | T Chimie physique.                                | SCHATZMANN .....                 | T Astrophysique.                                   |
| THELLIER .....                  | T Physique du Globe.                              | TERMIER .....                    | T Géologie générale.                               |
| L'HÉRITIER .....                | T Biologie gén. (Orsay).                          | ZAMANSKY .....                   | T Mathémat. générales.                             |
| GRIVET .....                    | T Radioélectricité (Orsay).                       | LENNUKY .....                    | T Physique (M. G. P.).                             |
| PONCIN .....                    | T Mécanique générale.                             | RIZET .....                      | T Génétique (Orsay).                               |
| DUBREIL .....                   | T Arithmétique et théorie<br>des nombres.         | ROUTHIER .....                   | T Géologie appliquée.                              |
| QUELET .....                    | T Chimie organique.                               | M <sup>me</sup> TONNELAT .....   | T Physique théorique.                              |
| CAGNIARD .....                  | T Géophysique appliquée.                          | DIXMIER .....                    | T Mathématiques (M. P. C.).                        |
| CHAMPETIER .....                | T Chimie macromolécul.                            | SOUCRAY .....                    | T Chimie générale.                                 |
| CUVILLIER .....                 | T Micropaléontologie.                             | AIGRAIN .....                    | T Electrotechn. générale.                          |
| JUNG .....                      | T Pétrographie.                                   | BRUSSET .....                    | T Chimie systématique.                             |
| TRILLAT .....                   | T Microscopie et diffraction<br>électronique.     |                                  |                                                    |
| WIEMANN .....                   | T Chimie org. et structur.                        |                                  |                                                    |
| JACQUINOT .....                 | T Spectroscopie et phy-<br>sique céleste (Orsay). |                                  |                                                    |



## Professeurs (suite)

|                                    |                                                 |                                      |                                                              |
|------------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| M. LÉVY .....                      | T Physique théorique des hautes énerg. (Orsay). | ELLENBERGER ....                     | T Géol. des grandes régions du globe.                        |
| M <sup>me</sup> CHAIX .....        | T Chimie biologique.                            | FRANC .....                          | T Biol. animale (P. C. B.).                                  |
| M <sup>me</sup> HUREL-PY .....     | T Biol. végétale (P. C. B.).                    | SCHNELL .....                        | T Botan. tropicale.                                          |
| PIAUX .....                        | T Chimie (M. P. C.).                            | STOLKOWSKI .....                     | T Physiologie végétale.                                      |
| BRUN .....                         | T Mécan. théor. des fluides.                    | ACHER .....                          | T Chimie Biol.                                               |
| LEDERER .....                      | T Chimie biolog. (Orsay).                       | BAUDOUIN .....                       | T Biol. anim. (P. C. B.).                                    |
| M <sup>me</sup> DUBREIL .....      | T Mathém. (Agrégation).                         | BEAUMONT .....                       | T Biol. anim. (S. P. C. N.).                                 |
| M <sup>me</sup> LELONG .....       | T Mathématiques II (E. N. S.).                  | BLAMONT .....                        | T Géophys., Ionosphère.                                      |
| BELLAIR .....                      | T Géologie (S. P. C. N.).                       | BOURREAU .....                       | T Botanique.                                                 |
| COTTE .....                        | T Physique électricité.                         | D. CURIE .....                       | T Physique (M. P. G.).                                       |
| J.-E. DUBOIS .....                 | T Chimie organique.                             | DURUAND-DELGA .....                  | T Géologie.                                                  |
| LAMOTTE .....                      | T Zoologie (E. N. S.).                          | FRÉON .....                          | T Chimie organ. (Orsay).                                     |
| A. MICHEL .....                    | T Chimie minér. (Orsay).                        | HELLER .....                         | T Physiologie végétale.                                      |
| OLMER .....                        | T Energétique générale.                         | TORTRAT .....                        | T Calcul des probabilités.                                   |
| ROUAULT .....                      | T Electricité (Orsay).                          | CAILLEUX .....                       | T Géologie (S. P. C. N.).                                    |
| GAUTHIER .....                     | T Mécanique appliquée.                          | MAGNAN .....                         | T Physique (S. P. C. N.).                                    |
| BARCHWITZ .....                    | T Chimie physique.                              | DAUDEL .....                         | T Mécan. ondul. appl. à la chimie théor. et à la phys. nucl. |
| BROSSEL .....                      | T Physique atomique.                            | M <sup>lle</sup> FOURCROY .....      | T Biol. végét. (S. P. C. N.).                                |
| BUSER .....                        | T Physiologie comparée.                         | M <sup>me</sup> CHOQUET-BRUHAT ..... | T Méc. analytique et Méc. céleste.                           |
| CAMUS .....                        | T Physique végét. (Orsay).                      | M <sup>me</sup> VEIL .....           | T Physiologie générale.                                      |
| CASTAING .....                     | T Physique II. Thermod. (Orsay).                | LWOFF .....                          | T Microbiologie.                                             |
| CURIEN .....                       | T Minéral. et cristallogr.                      | SIESTRUNK .....                      | T Mécan. phys. et expér.                                     |
| MOYSE .....                        | T Physiol. végét. (Orsay).                      | LACOMBE .....                        | T Calcul des métaux nucl. (Orsay).                           |
| NOIROT .....                       | T Evol. des êtres organisés.                    | BROCHARD .....                       | T Physique P.C.B. (Orsay).                                   |
| PANNETIER .....                    | T Chimie générale.                              | CABANNES .....                       | T Mécanique générale.                                        |
| POSSOMPES .....                    | T Zoologie.                                     | LESIEUR .....                        | T Mathématiques I (Orsay).                                   |
| PULLMANN .....                     | T Chimie quantique.                             | MAZET .....                          | T Mécanique génér. (Orsay).                                  |
| TEILLAC .....                      | T Physique nucl. et radio-activité.             | CAIRE .....                          | T Géographie physique et Géol. dynamique.                    |
| TONNELAT .....                     | T Biol. physico-chimique (Orsay).               | COMOLET .....                        | T Mécanique des fluides.                                     |
| VILLE .....                        | T Econométrie.                                  | CORABŒUF .....                       | T Physiol. anim. (Orsay).                                    |
| WILLEMART .....                    | T Chimie (P. C. B.).                            | DELLOUE .....                        | T Physique de l'exosphère.                                   |
| DODÉ .....                         | T Chimie (Orsay).                               | GORENFLOT .....                      | T Botanique II (Orsay).                                      |
| GREYMANN .....                     | T Recherches physiques.                         | HOULLON .....                        | T Biol. anim. (P. C. B.).                                    |
| GUINOCHE .....                     | T Biologie vég. (S.P.C.N.). (Orsay).            | J. JULIEN .....                      | T Chimie (P. C. B.) (Orsay).                                 |
| ROLLET .....                       | T Chimie minérale.                              | MALGRANGE .....                      | T Tech. math. de la phys. (Orsay).                           |
| M <sup>lle</sup> JOSIEN .....      | T Chimie (S. P. C. N.).                         | OLIVIER .....                        | T Anthropologie.                                             |
| CHEVALLEY .....                    | T Géomér. algèbr. et théor. des groupes.        | NOZERAN .....                        | T Botanique II (Orsay).                                      |
| ARNOULT .....                      | T Electronique (Orsay).                         | BLANC-LAPIERRE .....                 | T Phys. (E. N. S.) (Orsay).                                  |
| CHAPELLE .....                     | T Physique I (Orsay).                           | CHEVAUGEON .....                     | T Botanique (Orsay).                                         |
| DELANGE .....                      | T Mathématiques I (Orsay).                      | KAHANE .....                         | T Mathématiques (Orsay).                                     |
| DENY .....                         | T Mathém. génér. (Orsay).                       | SAMUEL .....                         | T Mathém. (E.N.S. féminin).                                  |
| GERMAIN .....                      | T Mécan. théor. des fluides.                    | KOURGANOFF .....                     | T Astronomie (Orsay).                                        |
| G. LUCAS .....                     | T Géologie.                                     | THIRY .....                          | T Mécanique céleste.                                         |
| ALLARD .....                       | T Chimie physique.                              | ABELES .....                         | T Physique (S. P. C. N.).                                    |
| BERTHELOT .....                    | T Phys. des partic. fond. (Orsay).              | AMAT .....                           | T Physique (P. C. B.).                                       |
| BRICARD .....                      | T Météorol. et physique de l'atmosphère.        | AUBOIN .....                         | T Géologie.                                                  |
| M <sup>me</sup> ALBE-FESSARD ..... | T Psychophysiology.                             | M <sup>me</sup> BENOIT-GUEUTAL ..... | T Phys. nucl. et radio-act. (Orsay).                         |
| FRIEDEL .....                      | T Physique des solides (Orsay).                 | BOUGIS .....                         | T Biologie marine (Villefranche-sur-Mer).                    |
| M. JULIA .....                     | T Etudes des moléculaires naturelles complexes. | BRUHAT .....                         | T Mathématiques (M. P. C.).                                  |
| LENDER .....                       | T Biol. animale (S. P. C. N.) (Orsay).          | BRUNN .....                          | T Géol. histor. (Orsay).                                     |
| MAGAT .....                        | T Physico-chim. des radio-éléments.             | CHABBAL .....                        | T Phys. (M. G. P.) (Orsay).                                  |
| M <sup>lle</sup> QUINTIN .....     | T Electrochimie.                                | DEHEUVELS .....                      | T Mathémat. théor. (Orsay).                                  |
| MONOD .....                        | T Chimie du métabolisme.                        | D'ESPAGNAT .....                     | T Physique théor. (Orsay).                                   |
| BERNOIT .....                      | T Physiol. anim. (Orsay).                       | FURON .....                          | T Géologie (S. P. C. N.).                                    |
| DE POSSEL .....                    | T Analyse numérique.                            | M <sup>me</sup> GANS .....           | T Génétique.                                                 |
| CHARLOT .....                      | T Chimie analytique.                            | GENÈVES .....                        | T Biologie végét. (P. C. B.).                                |
| LÉMÉE .....                        | T Physiol. vég. (Orsay).                        | GUILBERT .....                       | T Phys. (C. U. S. Orléans).                                  |
| GUÉRIN .....                       | T Chimie (M.P.C.) (Orsay).                      | HUPE .....                           | T Pétrographie.                                              |
| M. CHATELET .....                  | T Chimie (P. C. B.).                            | HOLLANDE .....                       | T Biologie générale.                                         |
| JEAN .....                         | T Phys. nucl. (Orsay).                          | LIONS .....                          | T Analyse numérique.                                         |
| MATTEI .....                       | T Physique (S. P. C. N.).                       | MAITTE .....                         | T Chimie (P. C. B.).                                         |
| BERGERARD .....                    | T Zoologie (Orsay).                             | MEYER .....                          | T Chimie propédeutique.                                      |
| BERTEIN .....                      | T Electronique (Orsay).                         | NICOLAS .....                        | T Géologie appliquée.                                        |
| BOUSSIÈRES .....                   | T Radiochimie.                                  | PANIGEL .....                        | T Biologie générale.                                         |
| M <sup>me</sup> COUTURE .....      | T Thermodynamique et méca. physique.            | RAVIER .....                         | T Pétrographie.                                              |
|                                    |                                                 | ROSEAU .....                         | T Mécan. théor. des fluides.                                 |
|                                    |                                                 | ROUBINE .....                        | T Electronique.                                              |
|                                    |                                                 | SILBER .....                         | T Chimie (P. C. B.).                                         |
|                                    |                                                 | ULBERSFELD .....                     | T Electronique.                                              |

## Professeurs (suite)

|                         |                                    |                   |                           |
|-------------------------|------------------------------------|-------------------|---------------------------|
| YVON .....              | T Théories physiques.              | BARRAUD .....     | Physiologie cellulaire.   |
| HERVÉ .....             | T Mathématiques.                   | LIORET .....      | Physiologie végétale      |
| NÉRON .....             | T Mathématiques (M. P. C.)         |                   | (Orsay).                  |
| M <sup>me</sup> PECKER- |                                    | DARS .....        | Géologie structurale et   |
| WIMEL .....             | T Astrophysique.                   |                   | géologie appliquée.       |
| BALKANSKY .....         | Physique (M. P. C.).               | CAMEFORT .....    | T Botanique (agrégation). |
| LE CORRE .....          | T Electricité.                     | VICHNIEWSKY ..... | T Mécanique industrielle. |
| DELCROIX .....          | T Physique théor. (Orsay).         | BLAQUIÈRE .....   | Electronique (Orsay).     |
| GOURDIN .....           | Physique théorique des             | ARNOUS .....      | T Physique théorique.     |
|                         | H <sup>tes</sup> Energies (Orsay). | TATIBOUET .....   | Chimie (C.S.U. Orléans).  |
| LEHMANN .....           | T Physique Expérimentale           | MALLIAVIN .....   | T Mathématique propéd.    |
|                         | des Hautes Energies                |                   | (Orsay).                  |
|                         | (Orsay).                           | GAUDEMAR .....    | T Chimie propéd.          |
| NATAF .....             | T Physique nucléaire et            | PÉREZ Y JORBA ..  | Physique exp. des Hautes  |
|                         | radio-activité (Orsay).            |                   | Energies (Orsay).         |
| ECHALIER .....          | Biologie anim. (P.C.B.).           | DAVID .....       | T Chimie (agrég., Orsay). |
|                         |                                    | BROUSSE .....     | T Mécanique théorique.    |

Secrétaire général ..... R. POUILLAIN.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE  
DE LA BIOSYNTHÈSE  
ET DU MÉTABOLISME  
DES ŒSTROGÈNES NATURELS

PAR

Lise CEDARD née WILLSTAETTER

---

Clinique obstétricale et gynécologique de la Faculté  
(P<sup>r</sup> J. VARANGOT)  
Maternité de Port-Royal - PARIS



## AVANT-PROPOS

**A**VANT TOUT PRÉAMBULE qu'il nous soit permis d'adresser à Monsieur le Professeur Varangot l'expression de notre respectueuse reconnaissance pour la confiance qu'il nous a témoignée et les encouragements qu'il n'a cessé de nous prodiguer depuis qu'il nous a accueillie dans son service.

Nous remercions très vivement Messieurs les Professeurs Lederer, Clauser et Baulieu qui ont bien voulu juger ce travail et nous donner de précieux conseils.

Nous sommes très reconnaissants à Monsieur le Professeur agrégé Granjon, Monsieur le Professeur Fontaine et Monsieur le Professeur Gallien qui nous ont honorée de leur confiance en nous permettant de participer à leurs travaux.

Tous les membres du personnel médical et hospitalier de la Maternité nous ont obligeamment apporté leur aide, nous permettant ainsi d'utiliser au maximum les possibilités du service de Monsieur le Professeur Varangot. Nous remercions plus particulièrement Messieurs les Docteurs Yannotti, Vassy, Chevallier, Parent et Giraud ainsi que Mesdames Israel, Decortet, Lescaroux, Simon et Raher. Nous avons également pu, au cours de nos recherches, bénéficier des précieux conseils de Messieurs les Professeurs Breuer, Jayle et de Monsieur le Docteur Diczfalusy et de l'aide pour certains essais spéciaux de Monsieur R. Ozon, Monsieur le Professeur agrégé Weinmann, Madame Colonge et Mademoiselle Corpechot.

Nous voulons enfin assurer de notre sincère reconnaissance toutes celles qui nous ont apporté leur collaboration technique et plus particulièrement Mesdames Alsat, Ego et Desjonquères qui ont eu une grande part dans la réalisation de ce travail.

Nous ne saurions oublier tout ce que nous devons au Centre National de la Recherche Scientifique dont l'aide matérielle nous a permis de mener à bien nos travaux.

*De nombreux produits nous ont été généreusement donnés par le Professeur Klyne, le Professeur Breuer, le Docteur Diczfalusy, les Docteurs Longchamp et Levitz, le Docteur Destouches (laboratoires Roussel UCLAF), le Docteur Fried (Squibb Institut), le Docteur Bowers (laboratoires Syntex), le Docteur Dumont (laboratoires Rolland), le Docteur Lecoq (laboratoires de l'Endopancrine), et par les laboratoires Spécia et Houdé, que nous remercions très vivement de leur aide.*

## INTRODUCTION

**D**EPUIS LA DÉCOUVERTE en 1929 de la folliculine dans les urines humaines, l'étude biochimique et physiologique des œstrogènes a réalisé des progrès considérables.

C'est surtout au cours de ces dernières années que l'introduction dans le domaine des stéroïdes de méthodes de recherches d'une grande précision : distribution à contre-courant, chromatographie sur colonne et sur papier, fluorimétrie, spectrographie infrarouge et surtout l'emploi de stéroïdes marqués par des substances radio-actives, a permis d'élargir considérablement le domaine de nos connaissances.

L'application de ces diverses méthodes aux expériences de perfusion glandulaire, à l'incubation *in vitro* de tranches ou de broyats d'organes a été en particulier d'une grande fécondité.

D'importantes lacunes subsistent cependant.

Elles sont dues à plusieurs facteurs : tout d'abord un grand nombre d'expériences ont été effectuées chez l'animal entier, or il existe selon les espèces des différences importantes dans les stéroïdes éliminés, aussi bien que dans les voies d'excrétion. Ces différences qualitatives et quantitatives entre les espèces rendent évidemment aléatoire l'extrapolation à l'espèce humaine d'un certain nombre de résultats obtenus chez les rongeurs.

Les cultures de tissu *in vitro*, ou l'incubation de fragments cellulaires tels les microsomes placentaires, permettent l'utilisation de tissus humains et ont fourni des renseignements extrêmement intéressants sur la biosynthèse des œstrogènes. Mais il s'agit là de conditions expérimentales assez particulières et rien ne montre l'importance respective des diverses activités enzymatiques ainsi mises en évidence. C'est la raison pour laquelle les expériences effectuées *in vivo* telles les perfusions de placentas humains *in situ* réalisées par Diczfalusy et ses collaborateurs sont du plus grand intérêt.

Cependant, certaines considérations morales et la législation française nous interdisent ces expériences qui nécessitent des interruptions de grossesse en cours d'évolution. A défaut, il nous a semblé que la perfusion

*in vitro* du placenta que M. le Professeur VARANGOT avait déjà réalisée en 1949 pouvait apporter des renseignements intéressants en permettant une étude dynamique du métabolisme dans des conditions que nous nous sommes efforcés de rendre aussi physiologiques que possible. Nous n'ignorons pas que ces conditions ne recréent pas exactement la situation existant *in utero* et là aussi les résultats, surtout lorsqu'ils sont négatifs, ne peuvent évidemment pas être acceptés aveuglément.

Reste l'étude des divers tissus et humeurs de l'organisme pour laquelle nous nous sommes heurtés à un grand nombre de problèmes. La plupart des résultats de la littérature portent sur les œstrogènes urinaires qui ont constitué pendant longtemps les seules possibilités d'analyse. On peut cependant penser que le dosage des œstrogènes dans le sang circulant ou dans les vaisseaux efférents aux tissus sécrétoires (ovaire, surrénale), voire dans ces tissus eux-mêmes, permet d'avoir une idée plus exacte de la physiologie des œstrogènes que l'exploration chimique des urines dont les constituants ne reflètent qu'indirectement le métabolisme des stéroïdes.

La mesure chimique des œstrogènes tissulaires et sanguins présente cependant de sérieuses difficultés, non seulement en raison des infimes quantités en présence, mais aussi à cause de l'existence de substances qui interfèrent avec les œstrogènes aussi bien lors des réactions colorées que lors des mesures fluorimétriques. C'est pourquoi nous avons, au début de nos recherches, porté tous nos efforts sur la mise au point d'une technique de dosage de grande sensibilité et d'une spécificité suffisante.

Le dosage fluorimétrique après chromatographie de partage, que nous avons adopté, nous a paru, dans ses applications aux divers tissus et humeurs de l'organisme, être un moyen analytique d'un grand intérêt.

Nous nous proposons dans ce travail d'exposer les détails de la technique, les résultats qu'elle nous a permis d'obtenir quant à l'influence de quelques états physiologiques et pathologiques sur le taux des œstrogènes urinaires et sanguins chez la femme, ainsi que les dosages des œstrogènes dans les liquides organiques autres que le sang veineux périphérique et les urines (liquide des kystes folliculaires, sang de la veine ovarienne). Nous énoncerons également les résultats que nous avons obtenus dans certains tissus (corps jaune, fibrome, muqueuse utérine, etc.) et les conclusions métaboliques que nous avons pu tirer de leur étude comparative et de certaines expériences effectuées *in vitro* aussi bien qu'*in vivo*.

L'ensemble de ces travaux nous a permis de vérifier certaines notions sur le métabolisme des œstrogènes normaux et pathologiques et en particulier le rôle de la muqueuse utérine pressenti par Pincus et Zahl en 1937 mais controversé depuis lors et dont nous avons pu démontrer qu'elle était capable de transformer en œstriol l'œstradiol d'origine ovarienne.

Nous discuterons aussi les résultats que nous avons obtenus au cours des perfusions de placentas humains *in vitro* : libération d'œstrogènes dans le milieu, transformation des œstrogènes, biosynthèse de ceux-ci à partir

de stéroïdes neutres ou hydroxylés sur le carbone 16. Ces derniers résultats nous semblent d'un grand intérêt car nous avons pu reproduire les deux voies de synthèse distinctes de l'œstrone et de l'œstradiol-17 $\beta$  d'une part, de l'œstriol d'autre part, que les expériences de Brown, Gallagher et Fishman *in vivo*, de Ryan et de Dorfman *in vitro* avaient permis d'envisager.

Nous avons également pu mettre en évidence l'action stimulatrice de l'addition de gonadotrophines chorioniques au liquide de perfusion, et nous discuterons les problèmes que cette constatation nous a posés.

Pour terminer, nous citerons les résultats obtenus chez quelques vertébrés inférieurs (poissons, batraciens) au cours de travaux effectués en collaboration avec les laboratoires du Professeur FONTAINE et du Professeur GALLIEN.

L'étendue des recherches effectuées sur la biosynthèse et le métabolisme des œstrogènes est si vaste que nous nous limiterons à l'exposé des notions chimiques et physiologiques fondamentales, renvoyant le lecteur pour plus de détails aux excellentes revues de Diczfalusy et Lauritzen (1961) et de Breuer (1962).



PREMIÈRE PARTIE

BRÈVE REVUE DE LA BIOSYNTHÈSE  
ET DU MÉTABOLISME  
DES ŒSTROGÈNES  
DANS L'ESPÈCE HUMAINE

I. — ISOLEMENT ET STRUCTURE CHIMIQUE  
DES ŒSTROGÈNES NATURELS

Les œstrogènes naturels ont été pour la plupart isolés à partir des urines de femmes enceintes (tableau I).

Les cinq principaux sont nommés de façon courante : œstrone, œstradiol-17 $\beta$ , œstriol, 16-épi-œstriol et 16 $\alpha$ -hydroxy-œstrone.

Alors que les trois premiers œstrogènes sont connus depuis près de 30 ans, les deux derniers, ainsi que de nombreux autres composés dont la formule structurale est indiquée dans la figure 2, sont de découverte beaucoup plus récente.

Du point de vue chimique, toutes ces substances dérivent d'un hydrocarbure saturé hypothétique à 18 atomes de carbone : l'*œstrane*.

Elles sont caractérisées par :

1° La nature aromatique du noyau stéroïdique A.

2° La présence d'un substituant oxygéné sur le carbone 17.

3° L'existence d'un groupement phénolique OH en C<sub>3</sub> qui donne à ces composés des propriétés faiblement acides. D'où le nom de phénolstéroïdes qu'on leur attribue souvent.

$$K \text{ œstriol} = 0,77 \cdot 10^{-9}$$

$$K \text{ œstrone} = 0,44 \cdot 10^{-9}$$

TABLEAU I. — ŒSTROGÈNES IDENTIFIÉS DANS LES EXTRAITS URINAIRES  
ET LES DIVERSES GLANDES ENDOCRINES.

| Composé<br>(nom usuel) | Urines de femmes<br>enceintes             | Autres urines                                          | Placenta<br>à terme                                                                                   | Ovaires<br>et utérus                                                                                                                                                                  | Testicules                                                                                                                             | Surrénales             |
|------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| Œstrone                | Doisy et coll. (1929)<br>Butenandt (1929) | Engel et coll. (1952)<br>Dingemause et coll.<br>(1938) | Westerfeld et<br>coll. (1938)<br>Mitchell et<br>Davies (1954)<br>Diezfalusy et<br>Lindkvist<br>(1956) | Liquide follicu-<br>laire et corps<br>jaune : Zander<br>et coll. (1959)<br>Liquide follicu-<br>laire : Short et<br>London (1961),<br>Smith (1960),<br>Granjon et<br>coll. (1958)      | Etalon :<br>Beall (1940)<br>Liquide sperma-<br>tique : Diezfa-<br>lusy (1954)                                                          | Bœuf :<br>Beall (1939) |
| Œstradiol-17 $\beta$   | Huffman et coll.<br>(1940)                | Engel et coll. (1952)<br>Smith et coll. (1952)         | Huffman et coll.<br>(1940)<br>Mitchell et<br>Davies (1954)<br>Diezfalusy et<br>Lindkvist<br>(1956)    | Corps jaune et<br>liquide folli-<br>culaire : Zan-<br>der et coll.<br>(1959)<br>Liquide follicu-<br>laire : Short et<br>London (1961),<br>Smith (1960),<br>Granjon et<br>coll. (1958) | Normal :<br>Golzicher et<br>Roberts (1952)<br>Tumeur :<br>Marti et Heu-<br>ser (1954)<br>Liquide sémi-<br>nal : Diezfa-<br>lusy (1954) |                        |
| Œstriol                | Marrian (1929)<br>Doisy et coll. (1939)   | Engel et coll. (1952)                                  | Browne (1930)<br>Mitchell et<br>Davies (1954)<br>Diezfalusy et<br>Lindkvist<br>(1956)                 |                                                                                                                                                                                       | Liquide sémi-<br>nal :<br>Diezfalusy<br>(1954)                                                                                         |                        |

|                                        |                                   |                                                                                                            |                                       |
|----------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| 17-épi-œstriol ...                     | Breuer (1961 c)                   | (1956)<br>Nocke (1962)                                                                                     | Halla (1958)                          |
| 16,17-épi-œstriol                      | Breuer (1961 c)                   | Après injection de<br>16 $\alpha$ et 16 $\beta$ -<br>hydroxy-œstrone<br>Nocke, Breuer et<br>Knuppen (1961) |                                       |
| 16 $\alpha$ -hydroxy-<br>œstrone ..... | Marrian et coll.<br>(1957 a et b) | Loke et coll.<br>(1958 b)                                                                                  |                                       |
| 16 $\beta$ -hydroxy-<br>œstrone .....  | Layne et Marrian<br>(1958 a)      | Après injection de<br>C <sub>14</sub> -œstradiol-17 $\beta$<br>Brown et coll.<br>(1958)                    |                                       |
| 16-céto-œstradiol-<br>17 $\beta$ ..... | Layne et Marrian<br>(1958 b)      | Après injection de<br>C <sub>10</sub> -œstradiol-17 $\beta$<br>Levitz et coll.<br>(1956)                   | Diezalusy et<br>Munstermann<br>(1959) |
| 16-céto-œstrone ..                     | Serchi (1953)                     | Après injection<br>d'œstrone<br>Slaunwhite et Sand-<br>berg (1956)<br>Migeon et coll.<br>(1959)            |                                       |
| 18-hydroxy-<br>œstrone .....           | Loke et coll. (1957<br>à 1959)    |                                                                                                            |                                       |

TABLEAU I. — ŒSTROGÈNES IDENTIFIÉS DANS LES EXTRAITS URINAIRES ET LES DIVERSES GLANDES ENDOCRINES (suite).

| Composé<br>(nom usuel)                                 | Urines de femmes<br>enceintes | Autres urines                                                                                                | Placenta<br>à terme                                                                                  | Ovaires<br>et utérus | Testicules | Surrénales                                                                           |
|--------------------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 2-méthoxy-<br>œstrone . . . . .                        | Loke et Marrian<br>(1958 a)   | Après injection<br>d'œstradiol-17 $\beta$<br>Kraychy et Gallag-<br>her (1957)<br>Engel et coll. (1957)       | Liquide de per-<br>fusion après<br>addition d'œs-<br>tradiol-17 $\beta$ et<br>H.G.G. Troen<br>(1961) |                      |            |                                                                                      |
| 2-méthoxy-<br>œstradiol . . . . .                      | Frandsen (1959)               |                                                                                                              |                                                                                                      |                      |            |                                                                                      |
| 2-méthoxy-œstriol                                      | Frandsen (1959)               | Après injection<br>d'œstradiol-17 $\beta$<br>Fishman et Gallag-<br>her (1958)                                |                                                                                                      |                      |            |                                                                                      |
| Equilénine . . . . .                                   |                               |                                                                                                              |                                                                                                      |                      |            | Tumeur fémini-<br>sante des sur-<br>rénales : Sal-<br>hanick et Ber-<br>liner (1957) |
| 11 $\beta$ -hydroxy-<br>œstradiol-17 $\beta$ . . . . . |                               | Femme castrée sur-<br>rénectomisée<br>après administra-<br>tion de cortisone<br>Chang et Dao (1961-<br>1962) |                                                                                                      |                      |            |                                                                                      |

**Œstrogènes classiques** (fig. 1)

1° **L'œstrone.** — En 1923, Allen et Doisy provoquèrent l'œstrus vaginal chez la souris castrée, par l'injection de liquide folliculaire de truie et attribuèrent cette activité à une hormone sécrétée par le follicule de de Graaf qu'ils nommèrent « folliculine ». Ils proposèrent comme test de la présence de substances œstrogènes, la kératinisation de la muqueuse vagi-

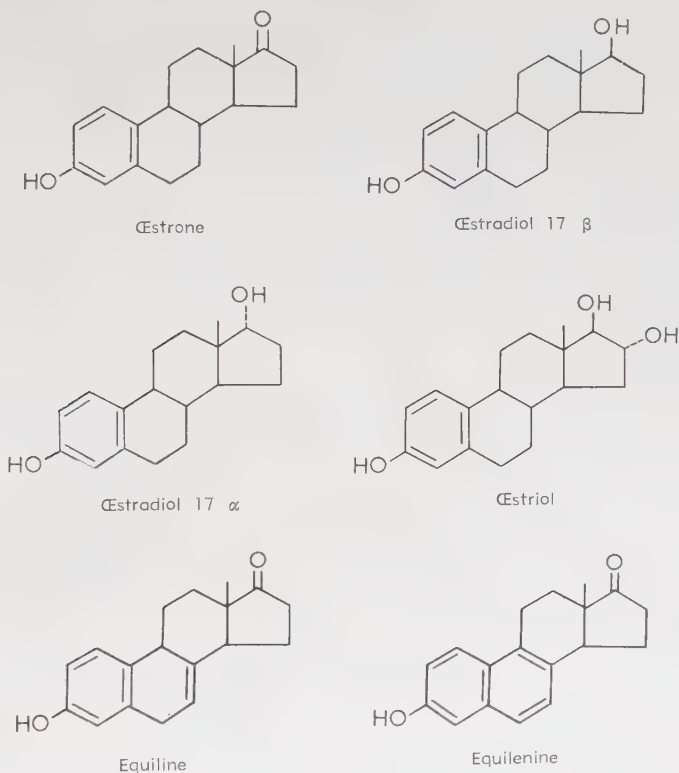


FIG. 1.

nale de la rate castrée. Ce test fut d'une utilité considérable en permettant une étude facile et plus ou moins quantitative de la teneur en œstrogène des humeurs et des tissus.

En 1927, Asheim et Zondek montrèrent que l'urine de femme enceinte contient des quantités très importantes de corps œstrogènes, et c'est à partir de ce matériel que Doisy, Veller et Thayer, puis Butenandt obtinrent en 1929 la première substance œstrogène cristallisée : la *folliculine*.

Les premiers essais tentés pour élucider la structure de la folliculine

montrèrent que ce corps possédait une fonction cétone en  $C_{17}$  et un hydroxyle phénolique en  $C_3$ .

L'existence de cette fonction cétone permit à A. Girard de préparer industriellement la folliculine à partir de l'urine de jument gravide qui renferme 30 à 40 fois plus d'œstrogènes que l'urine de femme enceinte.

Cette substance dénommée couramment *œstrone* a été ensuite isolée de nombreuses sources : urines d'hommes (Dingemanse et collaborateurs, 1938), tissu placentaire humain (Westerfeld et collaborateurs, 1938), glandes surrénales de bœufs (Beall, 1939), bile de vaches gravides (Pearlman et collaborateurs, 1947).

2° L'*œstradiol-17 $\beta$*  (hydroxyle-OH en  $C_{17}$ ) fut isolé initialement par Mac Corquodale et collaborateurs (1935) à partir du liquide folliculaire d'ovaire de truie, puis d'urines de femmes enceintes (Huffman et collaborateurs, 1940), de testicule de cheval (Beall, 1940) et d'urines d'étalon (Levin, 1945). L'activité biologique de cette hormone sur le test de kératinisation vaginale de la rate ou de la souris castrée est très importante (deux fois et demie celle de l'*œstrone*) et on a longtemps considéré l'*œstradiol-17 $\beta$*  comme la seule hormone ovarienne humaine. Son isomère l'*œstradiol-17 $\alpha$*  a surtout de l'importance chez les bovidés. Il semble absent dans l'espèce humaine.

3° L'*œstriol* a été isolé à partir des urines de femmes enceintes (Marrian, 1930) et du tissu placentaire humain (Browne, 1930). On l'a longtemps considéré comme spécifique de l'espèce humaine; cette notion semble actuellement erronée mais l'*œstriol* est totalement absent chez certains animaux tels les bovidés (Velle, 1958-1960).

Dans les dosages biologiques utilisant les rats ou les souris castrées, l'*œstriol* est moins actif dans le test de kératinisation vaginale que l'*œstrone* ou l'*œstradiol*.

Mais plus récemment, Overbeek et Visser, chez la rate castrée (1958), Puck et Hubner chez le lapin et le cobaye (1956) et enfin Puck (1957-1960), Borglin (1959) chez la femme, ont montré qu'en fait l'*œstriol* possédait une activité biologique importante même à petites doses.

Ces faibles doses (50  $\mu\text{g}$  *per os* chez la femme, ou 10  $\mu\text{g}$  par jour pendant cinq jours) suffisent en effet pour multiplier les glandes cervicales et stimuler leur sécrétion ainsi que pour produire une prolifération de l'épithélium vaginal sans retentissement sur l'endomètre.

L'*œstriol* semble être le métabolite essentiel de la grossesse humaine, il constitue en fin de gestation plus de 90 % de la totalité des œstrogènes urinaires.

La molécule d'*œstriol* contient un hydroxyle en position 16 $\alpha$  qui forme une fonction trans-glycol avec l'hydroxyle voisin en  $C_{17}$ . Ce groupement hydroxyle supplémentaire donne à l'*œstriol* une plus grande solubilité dans l'eau.

4° Nous n'insisterons pas sur l'équiline et l'équilénine isolées par Girard dans les urines de juments gravides; ni sur leurs dérivés hydroxylés sur le carbone 17 (dihydro-équiline, dihydro-équilénine). Ces substances possèdent un noyau B désaturé qui modifie leurs propriétés chimiques et biologiques, elles semblent jusqu'à présent n'avoir que peu d'importance dans l'espèce humaine.

### Nouveaux œstrogènes (fig. 2)

Depuis 1955 de nombreux autres œstrogènes ont été isolés à partir des urines humaines, certains pendant la grossesse, essentiellement par Marrian et ses élèves, d'autres comme métabolites de produits administrés,

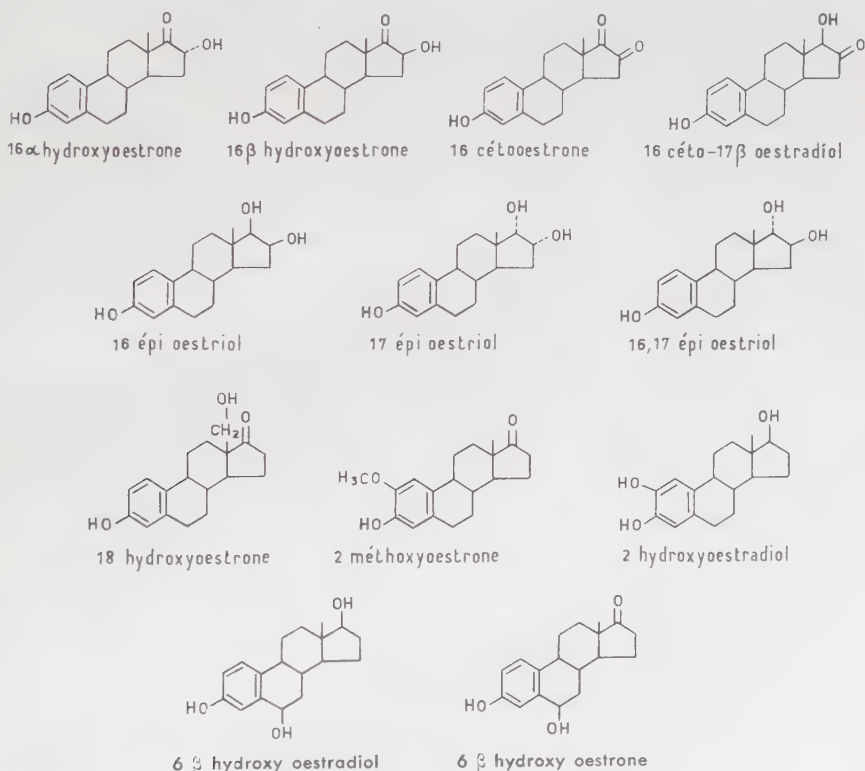


FIG. 2. — Œstrogènes de découverte récente.

surtout par Gallagher et ses collaborateurs et par Breuer et collaborateurs (tableau I).

Il s'agit de dérivés formés par hydroxylation, oxydation, réduction, épimérisation ou méthylation des œstrogènes classiques et qui sont le plus

souvent dépourvus d'activité biologique. Nous reviendrons ultérieurement sur leur mode de formation.

1° **Les isomères de l'œstriol.** — Marrian et Bauld (1955) ont isolé le 16-épi-œstriol (œstra-1,3,5-triène-3)-16 $\beta$ -17 $\beta$ -triol) dans les urines de femmes enceintes, puis Diczfalusy et Halla (1958) ont isolé et identifié ce métabolite dans les placentas à terme.

Loraine et collaborateurs (1957) ont démontré que cette substance ne possède qu'une très faible activité biologique dans le test de kératinisation vaginale des rongeurs castrés.

Breuer et collaborateurs (1961 c) ont également, par microsublimation, pu isoler des urines de femmes enceintes le 16-17-épi-œstriol (œstriol 16 $\beta$ -17 $\alpha$  et le 17-épi-œstriol (œstriol 16 $\alpha$ -17 $\alpha$ ).

Ces deux isomères sont d'ailleurs quantitativement peu abondants par rapport au 16-épi-œstriol et à l'œstriol mais sont intéressants pour la compréhension de la chaîne métabolique des œstrogènes.

2° **Les dérivés 16-cétoliques.** — Marrian et collaborateurs ont successivement isolé et identifié dans les urines de femmes enceintes :

— 16 $\alpha$ -hydroxy-œstrone (Marrian et collaborateurs, 1957 a et b);

— 16 $\beta$ -hydroxy-œstrone (Layne et Marrian, 1958 a);

— 16-céto-œstradiol 17 $\beta$  (Layne et Marrian, 1958 b),

tandis que Levitz, Spitzer et Twombly (1956) avaient également pu déceler du 16-céto-œstradiol radio-actif dans les urines de sujets humains après administration de 16  $^{14}\text{C}$ -œstradiol-17 $\beta$  et que Diczfalusy et Munstermann (1959) identifiaient enfin cette substance dans le tissu placentaire humain.

Brown, Fishman et Gallagher (1958) détectèrent également de la 16 $\beta$ -hydroxy-œstrone radio-active dans les urines de sujets traités avec du 16  $^{14}\text{C}$ -œstradiol-17 $\beta$ .

Le dosage quantitatif de ces œstrogènes cétoliques a été effectué de façon systématique au cours de la grossesse par Hobkirk et Nilsen (1962) et en dehors de celle-ci par Hobkirk (1963).

3° **Les dérivés substitués sur le carbone 2.** — La 2-méthoxy-œstrone (Kraychy et Gallagher, 1957), le 2-méthoxy-œstriol (Fishman et Gallagher, 1958) et la 2-hydroxy-œstrone (Fishman et collaborateurs, 1960 b) radio-actifs ont été isolés et identifiés dans les urines de sujets normaux après administration de 16  $^{14}\text{C}$ -œstradiol-17 $\beta$ , tandis que le 2-méthoxy-œstradiol et le 2-méthoxy-œstriol (Frandsen, 1959) ainsi que la 2-méthoxy-œstrone (Loke et Marrian, 1958 a) étaient isolés des urines de femmes enceintes.

Hobkirk et Nilsen (1963) d'une part, Fishman (1963) d'autre part ont étudié respectivement l'importance de la 2-méthoxy-œstrone et de la 2-hydroxy-œstrone comme métabolite des œstrogènes exogènes ou endogènes.

4° D'autres dérivés semblent avoir une importance physiologique moindre.

La **18-hydroxy-œstrone**, moins polaire que les dérivés 16-cétoliques, a été isolée puis identifiée par Loke, Watson et Marrian (1957-1959).

Les dérivés substitués sur le carbone 6, s'ils ont été identifiés de façon formelle au cours d'expériences *in vitro* (Breuer et Knuppen, 1960 a) n'ont pas pu l'être dans les urines de femmes enceintes (Marrian, 1961). La faible solubilité de ces dérivés dans l'éther rend en effet leur recherche difficile.

Enfin Chang et Dao (1961-1962) ont découvert et identifié **11 $\beta$ -hydroxy-œstrone** et **11 $\beta$ -hydroxy-œstradiol-17 $\beta$**  dans les urines d'une femme castrée et surrénalectomisée après administration de 4 <sup>14</sup>C-cortisone.

## II. — LIEU DE FORMATION DES ŒSTROGÈNES DANS L'ESPÈCE HUMAINE

Les principales sources de production des œstrogènes dans l'espèce humaine sont l'ovaire et le placenta. Les œstrogènes sont aussi sécrétés en petites quantités par le cortex surrénal et les testicules.

### *L'ovaire*

L'ovaire est le lieu de production le plus important chez la femelle non enceinte.

Nous exposerons ultérieurement les notions récentes concernant les modalités de cette synthèse et le rôle respectif de ses divers éléments constitutifs.

Pour l'instant, nous citerons simplement comme preuve de la production d'œstrone et d'œstradiol dans l'ovaire humain les faits suivants :

a) Diminution de l'élimination urinaire des œstrogènes chez les femmes castrées et disparition de son caractère cyclique (voir à ce sujet la revue de Carcatzoulis, 1961 a), ainsi qu'atrophie des organes sexuels secondaires que seule la greffe ovarienne ou l'injection de substances œstrogènes peuvent faire disparaître.

b) L'augmentation de l'élimination urinaire des œstrogènes après administration de F.S.H. hypophysaire humaine habituelle chez les femmes normales ne se produit pas en l'absence des ovaires (Gemzell, Diczfalusy et Tillinger, 1959).

c) La concentration de l'œstrone et de l'œstradiol-17 $\beta$  est plus élevée dans le sang veineux ovarien que dans le sang veineux périphérique (Hardy et collaborateurs, 1957; Varangot et collaborateurs, 1959).

d) Découverte d'une activité biologique (Allen et collaborateurs, 1930), puis constatation de la présence d'œstrone et d'œstradiol-17 $\beta$  dans le liquide folliculaire humain (Granjon et collaborateurs, 1958; Zander et Diczfalusy, 1959; Smith, 1960; Short et collaborateurs, 1961), et dans les corps jaunes (Zander et Diczfalusy, 1959).

e) Isolement d'œstrone et d'œstradiol radio-actifs après incubation d'acétate marqué au carbone 14 avec des homogénats d'ovaire humain (Rabinowitz, 1956) ou des coupes d'ovaires (Wotiz et Lemon, 1958; O'Donnell et Mc Caig, 1959).

### *Le placenta*

Le rôle prépondérant du placenta dans la synthèse des œstrogènes au cours de la grossesse n'est plus discuté. Les preuves de la production d'œstrogènes dans le placenta étant universellement reconnues, nous n'en citerons que quelques-unes :

a) Il existe un parallélisme entre l'augmentation du poids du placenta et l'élimination urinaire des œstrogènes au cours de la grossesse, avec retour rapide aux taux normaux après l'accouchement.

On observe par ailleurs une élimination œstrogénique encore assez importante chez les femmes enceintes, atteintes de maladie d'Addison, surrénalectomisées ou castrées. Dans les tumeurs d'origine placentaire (môle ou chorio-épithéliome), plusieurs auteurs ont noté une augmentation des œstrogènes urinaires disparaissant après exérèse de la tumeur.

b) Stewart (1951) a pu, par des implants oculaires de placenta à terme, stimuler l'utérus de la lapine castrée dont les urines se chargent d'œstrogènes, et les cultures de tissu avec des fragments placentaires au 8<sup>e</sup> mois semblent indiquer une sécrétion œstrogénique *in vitro* (Declerck, 1956).

c) Mitchell et Davies (1954), puis Diczfalusy et ses collaborateurs (1953, 1956, 1958) ont isolé du placenta frais de grandes quantités d'œstrogènes.

Diczfalusy et ses collaborateurs ont par ailleurs remarqué que, comme dans les autres tissus sécrétant des œstrogènes (corps jaune par exemple), les œstrogènes libres prédominent sur les œstrogènes conjugués et ils ont estimé la production journalière du placenta près du terme à 50 ou 100 mg d'œstrogènes (1960). On peut localiser cette production dans les éléments syncytiaux, mais on ne connaît pas exactement le rôle respectif des éléments maternels et fœtaux. On sait seulement qu'une circulation fœtale adéquate et une bonne connexion fœto-placentaire sont indispensables (Cassmer, 1959).

d) Nous ne ferons que citer ici les expériences de perfusion placentaire *in vitro* qui ont montré la formation d'œstrogènes à partir d'acétate radio-actif (Levitz et collaborateurs, 1955), et l'aromatisation des stéroïdes neutres

en œstrogènes par la fraction microsomique du tissu placentaire (Meyer, 1955; Ryan, 1958, 1959; Longchamp et collaborateurs, 1960 a).

Nous nous proposons en effet d'étudier plus en détail ces expériences dans un prochain chapitre.

### *Le cortex surrénal*

a) Une petite mais régulière quantité d'œstrogènes paraît être produite par le cortex surrénal chez la femme aussi bien que chez l'homme, comme le prouve le maintien d'une certaine élimination urinaire d'œstrogènes après la castration (Bulbrook, 1958) ou à la ménopause (Mac Bride, 1957; Nissenmeyer et Sanner, 1962, et revue de Carcatzoulis, 1961 b). Dao (1953). Bulbrook et Greenwood (1957) ont de plus montré que chez les malades atteintes du cancer du sein et soumises à une ovariectomie puis une surrénalectomie bilatérale, les œstrogènes urinaires tombaient à des taux voisins de zéro.

b) L'A.C.T.H. a la possibilité de stimuler la sécrétion œstrogénique surrénalienne chez les femmes castrées (Sandberg, Paulsen, Leach et Maddock, 1958; Breuer, Nocke et Bayer, 1958 a; Brown, Falconer et Strong, 1959).

c) Certaines tumeurs surrénales aussi bien chez l'homme que chez la femme produisent de grandes quantités d'œstrogènes que l'on retrouve dans les urines (Simpson et Joll, 1938; Dohan et collaborateurs, 1953) et il est raisonnable de penser que ces substances dérivent d'un tissu surrénal hyperactif.

d) Enfin, outre la découverte par Beall (1939) d'œstrone dans les surrénales de bœuf, des expériences *in vitro* ont montré la capacité des préparations surrénales à transformer certains androgènes (Meyer, 1955) ou certains corticoïdes en œstrogènes (Chang et Dao, 1959). Cependant, on ne peut encore savoir exactement si le cortex surrénal produit lui-même les œstrogènes dits surrénaux, ou s'il forme des précurseurs qui sont transformés en œstrogènes dans d'autres tissus (Chang et Dao, 1961-1962).

### *Le testicule*

Il existe en effet dans l'organisme mâle des sources importantes d'œstrogènes.

a) Beall (1940) a montré que le testicule d'étalon est très riche en œstrogènes (360  $\mu\text{g}$  d'œstrone et 210  $\mu\text{g}$  d'œstradiol par kg). Dans les urines d'étalon, on a trouvé jusqu'à 300.000 U.S. par litre, ce qui dépasse de loin le contenu des urines de jument gravide.

Chez l'homme, il existe également des œstrogènes dans les urines mais en quantités très faibles.

b) La production d'œstrogènes par les testicules (plus précisément, semble-t-il, par les cellules de Leydig) peut être stimulée par les gonadotrophines chorioniques (Maddock et collaborateurs, 1952; Jayle et collaborateurs, 1958), chez les addisoniens ou les malades à hypofonctionnement testiculaire, alors que la réponse est nulle chez les sujets castrés (Jayle, Decourt et Doumic, 1959).

c) Goldzieher et Roberts (1952) ont détecté la présence d'œstradiol-17 $\beta$  dans le tissu testiculaire humain, tandis que Diczfalusy (1954) a montré que le liquide séminal humain contient œstradiol-17 $\beta$ , œstrone et œstriol.

d) Enfin, on a pu isoler de l'œstradiol radio-actif après incubation avec de l'acétate marqué, d'homogénats de tissu testiculaire humain (Rabinowitz, 1956) ou de tranches de tumeurs du testicule (Wotiz, Davis, Lemon, 1955 a).

### III. — BIOGÉNÈSE DES ŒSTROGÈNES NATURELS

En passant en revue la biochimie des stéroïdes en 1953, Lieberman et Teich avaient pu dire que « pratiquement rien n'est connu concernant le mécanisme de la biosynthèse des œstrogènes ».

Depuis lors, heureusement, de nombreuses informations ont été obtenues, et les travaux récents de Ryan et Smith (1961) donnent de cette biosynthèse, tout au moins au niveau de l'ovaire, une explication très cohérente.

a) **A partir de l'acétate.** — Les travaux de Heard et collaborateurs (1954 a) sur les urines de jument gravide ont montré que l'administration d'acétate marqué par du carbone 4 C<sup>14</sup> à une jument gravide était suivie de l'excrétion urinaire d'œstrone, d'équiline et d'équilénine marquées, ces deux dernières substances ayant une activité plus faible que celle de l'œstrone (Heard et collaborateurs, 1956).

A l'inverse (1954 b), l'administration de cholestérol 4 C<sup>14</sup> n'entraînait aucune élimination d'œstrone radio-active, tandis que la fraction stéroïde neutre à 21 atomes de carbone possédait une radio-activité notable.

*In vitro*, les perfusions de placenta humain (Levitz, Condon, Dancis, 1955) \* et d'ovaires de truie (Werthessen, Schwenck, Baker, 1953), avec un milieu contenant C<sup>14</sup>-acétate, donnèrent naissance à de l'œstrone et de l'œstradiol-17 $\beta$  marqué.

---

\* LEVITZ et collaborateurs (1962) ont récemment signalé qu'ils n'étaient plus parvenus à reproduire leur expérience princeps.

Rabinowitz et Dowben (1955) ont démontré l'incorporation de ( $2^{14}\text{C}$ )-acétate en cholestérol, œstrone et œstradiol-17 $\beta$  par des tranches et des homogénats d'ovaire de chien.

De même, Rabinowitz (1956) a montré que les homogénats testiculaires (chien, chat, homme) incorporaient le ( $2^{14}\text{C}$ )-acétate en œstradiol-17 $\beta$ .

Dans les tranches d'ovaires humains, Wotiz et Lemon (1958) obtinrent à partir de  $^{14}\text{C}$ -acétate la formation d'œstrone et d'œstradiol-17 $\beta$ , tandis que O'Donnel et Mc Caig (1959) obtenaient ces deux œstrogènes ainsi que de l'œstriol avec des ovaires de syndrome de Stein-Leventhal.

Wotiz, Davis et Lemon (1955 a) avaient également pu réaliser la synthèse par une tumeur testiculaire humaine d'œstrone et d'œstradiol-17 $\beta$  (plus progestérone, testostérone et androstène-dione) à partir de ( $1^{14}\text{C}$ )-acétate.

**b) A partir du cholestérol.** — Dans une série de recherches poursuivies sur les ovaires de lapine, Claesson et collaborateurs (1947) auraient identifié un ester du cholestérol comme le promoteur ovarien des œstrogènes. Leur conclusion est basée principalement sur le fait que la concentration du cholestérol diminue rapidement dans l'ovaire après l'injection de gonadotrophines, comme dans la surrénale après l'injection d'A.C.T.H.

Falck (1953) a en outre démontré que, chez le rat impubère, la réponse ovarienne aux gonadotrophines se produit au moment d'une accumulation manifeste de cholestérol qui diminue très brusquement ensuite.

Werbin, Plotz et Davis (1957) ont enfin établi par la technique de dilution isotopique la conversion du ( $4^{14}\text{C}$ )-cholestérol en œstrone urinaire chez la femme enceinte.

Il semble actuellement certain que la progestérone ou la prégnénolone sont les intermédiaires obligatoires de cette transformation (Smith et Ryan, 1961).

**c) A partir des androgènes.** — La transformation de la testostérone en substance œstrogénique active a été rapportée pour la première fois par Steinach et Kun (1937) chez l'homme après administration de propionate de testostérone.

En 1939, Dorfman et Hamilton, Hoskins et collaborateurs, Callow et collaborateurs montrèrent de façon formelle par dosage biologique l'élévation des stéroïdes phénoliques dans les urines d'hommes castrés ou non, ou de singes après traitement par la testostérone.

Plus récemment, West, Damast, Sarro et Pearson (1956) isolèrent des urines, par distribution à contre-courant, de l'œstrone et de l'œstradiol-17 $\beta$ , après administration de propionate de testostérone à des femmes castrées et surrénalectomisées pour cancer du sein.

Heard, Jellineck et O'Donnel (1955) obtinrent d'autre part chez la jument gravide la conversion de la ( $4\text{C}^{14}$ )-testostérone en œstrone urinaire, alors que l'équilénine par contre était dépourvue de toute radio-activité. Cette expérience démontrait donc que les œstrogènes à noyau B désaturé sont

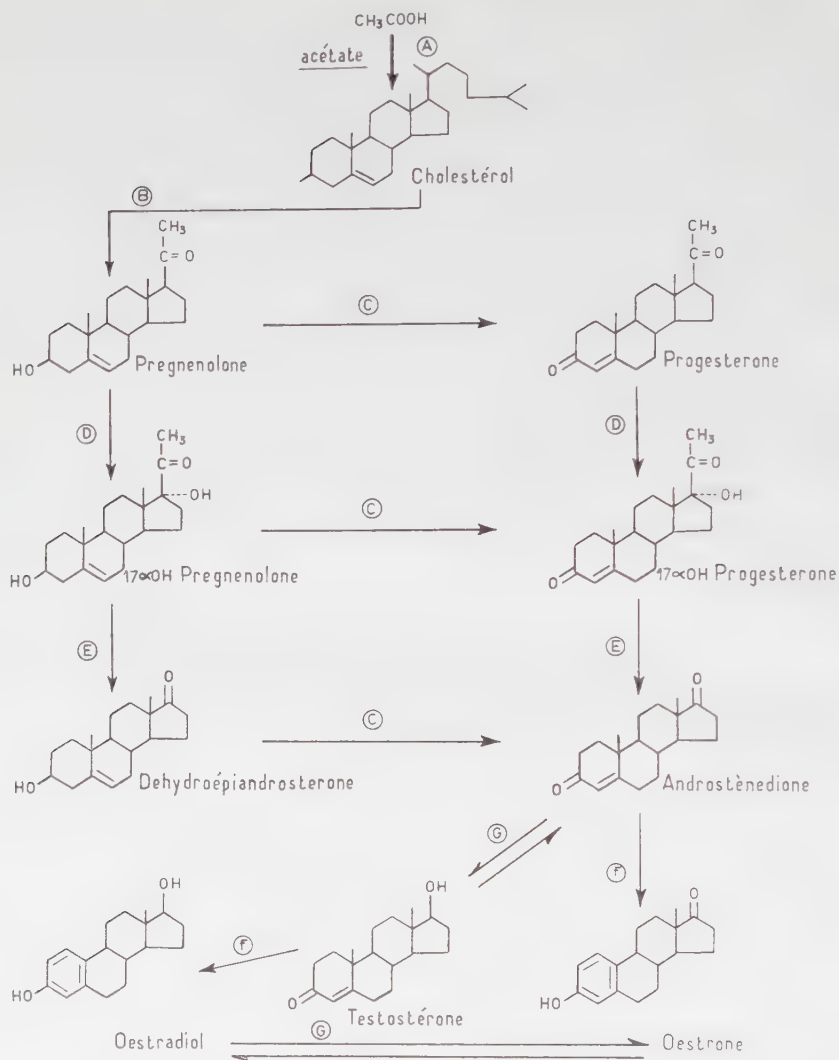


Fig. 3. — Voie métabolique possible pour la biogénèse ovarienne des œstrogènes.

(Les lettres situées au-dessus des flèches indiquent l'ordre et les systèmes enzymatiques nécessaires).

A, formation du noyau stéroïde; B, coupure de la chaîne latérale du cholestérol avec formation de stéroïdes à 21 atomes de carbone; C, réaction d'isomérisation avec déplacement de la double liaison de C5 en C4 et déshydrogénation en C3; 3 $\beta$ ol-déshydrogénase; D, 17 $\alpha$ hydroxylation, c'est-à-dire introduction d'un radical hydroxyle en position  $\alpha$  sur le carbone 17; E, coupure de la chaîne latérale des stéroïdes en C21 produisant des stéroïdes en C19; F, aromatisation, c'est-à-dire introduction de doubles liaisons dans le noyau A avec conversion des stéroïdes C19 en C18; G, réaction de 17 $\beta$ ol-déshydrogénation (réversible) c'est-à-dire conversion du radical hydroxyle en position  $\beta$  sur le carbone 17 en groupe cétonique ou inversement (in SMITH et RYAN, 1962, *Am. J. Obst. Gyn.*, 84, 141, 1962).

synthétisés à partir de l'acétate par une voie métabolique différente de celle de l'œstrone.

*In vitro*, l'aromatisation des stéroïdes neutres en œstrogènes a été étudiée dans plusieurs espèces et avec plusieurs tissus ou micro-organismes.

Des séries d'expériences effectuées en particulier par Meyer (1955), puis Ryan (1958-1959 a) ainsi que par Dorfman et collaborateurs (1959-1962) prouvèrent avec certitude que la transformation des androgènes en stéroïdes phénoliques à 18 atomes de carbone peut être effectuée par de nombreux tissus tels que la surrénale, le testicule et surtout l'ovaire et le placenta.

Les composés oxygénés en 19 (19-hydroxy-androstènedione, 19-oxo-androstène-3-17-dione) (Meyer, 1955; Longchamps et collaborateurs, 1960 a) semblent jouer un rôle intermédiaire dans ces réactions dont les modalités exactes ainsi que les facteurs qu'elles nécessitent sont maintenant fort bien étudiés. Ryan, en particulier, a montré que la totalité des enzymes requis pour cette transformation se trouvait dans la fraction microsomique du placenta humain, et qu'ils agissaient en présence de tri-phosphopyridine nucléotide réduite et d'oxygène atmosphérique. Cette aromatisation s'accompagne de la production équimoléculaire de formaldéhyde (Breuer et Grill, 1961; Axelrod et Goldzieher, 1962 a).

d) **Les expériences récentes de Ryan et Smith** (1961 a, b, c, d) ont permis de clarifier ces problèmes en montrant qu'il n'y avait pas trois voies métaboliques distinctes, mais plutôt une seule voie de synthèse que l'on peut résumer dans la figure 3.

Ces auteurs ont en effet effectué des expériences dans lesquelles le tissu ovarien stimulé au préalable par les gonadotrophines était incubé avec divers précurseurs radio-actifs.

Ils ont constaté que la récupération d'œstrogènes était de :

- 0,03 % à partir de l'acétate,
- 0,10 % à partir de cholestérol,
- 5,5 % à partir de progestérone,
- 15,0 % à partir de l'androstènedione.

On voit que la récupération d'œstrogènes devient d'autant plus grande que moins de stades intermédiaires sont en cause.

Ryan et Smith ont pu également isoler les stéroïdes neutres de transition et confirmer ainsi que le biogénèse des œstrogènes à partir de l'acétate suit dans l'ovaire la voie suivante : acétate : cholestérol : progestérone ou prègnénolone : 17 $\alpha$ -hydroxy-progestérone ou 17 $\alpha$ -hydroxy-prègnénolone : androstène-3-17-dione.

Il semble bien par ailleurs qu'il existe dans le placenta une voie métabolique spéciale, donnant directement naissance à l'œstriol par aromatisation d'androgènes hydroxylés au préalable sur le carbone 16 (Ryan, 1959 b). Nous nous proposons de revenir ultérieurement sur ce problème qui a fait l'objet d'une partie importante de nos travaux personnels.

#### IV. — MÉTABOLISME INTERMÉDIAIRE *IN VIVO* ET *IN VITRO*

a) Les connaissances sur le métabolisme intermédiaire des œstrogènes se sont résumées pendant une vingtaine d'années au schéma classique de Pincus et Zahl (1937).



L'œstradiol-17 $\beta$  ou 17 $\alpha$  (suivant les espèces) est facilement converti en œstrone et vice versa, l'œstrone est à son tour transformé en œstriol, ces réactions ayant essentiellement lieu au niveau du foie.

De nombreux auteurs (voir tableau II) purent, après administration d'œstradiol-17 $\beta$  ou d'œstrone, isoler de l'œstrone, de l'œstradiol, ou de l'œstriol dans les urines d'homme, de singe ovariectomisé, de lapin ou de cobaye, alors que l'œstriol était considéré comme un produit terminal dans la dégradation des œstrogènes parce qu'il était retrouvé pour plus de 50 % dans les excréats après administration à l'animal et parce qu'il ne donnait lieu dans l'organisme à la formation d'aucun dérivé connu.

b) Cependant ce schéma abrégé s'est révélé insuffisant. Le tableau plus complet mais encore non définitif que l'on peut dresser à l'heure actuelle est dû aux progrès réalisés au cours des dix dernières années, portant en particulier sur l'identification de nouveaux métabolites urinaires et sur leurs conversions métaboliques *in vivo* et *in vitro*. C'est l'introduction de technique de séparation et de mesure plus spécifiques ou plus précises et surtout l'emploi de traceurs radio-actifs qui ont rendu possibles ces progrès dans la compréhension du métabolisme des œstrogènes.

Cette dernière technique a également permis de mieux apprécier les lacunes de nos connaissances dans ce domaine puisque, après administration d'œstrone ou d'œstradiol radio-actif, 60 % seulement de la radio-activité retrouvée dans les urines correspond à des métabolites connus.

Les principales transformations métaboliques de la molécule œstrogénique sont des hydroxylations (sur les carbones 2, 6, 16 et 18), des oxydations, des réductions et des méthylations. Il peut également se produire des épimérisations, époxydations (Breuer, 1962 b) et formation de p-quinol (Hecker, 1958).

Il est certain que le foie joue le rôle le plus important dans ces processus métaboliques, mais certains autres tissus ont également un rôle, surtout l'intestin, les reins, les poumons et le sang.

Pour plus de clarté et afin de ne pas surcharger cet exposé, nous avons préféré grouper en tableaux (tableaux II et III) les résultats des études

TABLEAU II — MÉTABOLISME INTERMÉDIAIRE DES ŒSTROGÈNES IN VIVO.

| Sujet                                         | Substance administrée           | Produits isolés dans les urines | Auteurs                            |
|-----------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| Homme .....                                   | Œstradiol-17 $\beta$            | Œstrone                         | Heard et Hoffman (1941 a)          |
| Lapine .....                                  | Œstradiol-17 $\beta$            | Œstrone                         | Heard et coll. (1941 b)            |
| Cobaye mâle et femelle ovariectomisée .....   | Œstradiol-17 $\beta$            | Œstrone                         | Fish et coll. (1941)               |
| Lapine ovariectomisée et hystérectomisée .... | Œstradiol-17 $\beta$            | Œstrone                         | Fish et coll. (1942)               |
| Guenon gravide ..                             | Œstradiol-17 $\beta$            | Œstrone                         | Dorfman et coll. (1945)            |
| Femme .....                                   | Œstradiol-17 $\beta$            | Œstriol                         | Stimmel et May (1953)              |
| Femme enceinte ..                             | Œstradiol-17 $\beta$            | Œstrone, adioliol, Œstriol      | Fishman, Brown et Gallagher (1962) |
| Lapin .....                                   | Œstrone                         | Œstradiol-17 $\alpha$           | Stroud (1939)                      |
| Chien .....                                   | Œstrone                         | Œstradiol-17 $\alpha$           | Pearlman et coll. (1948)           |
| Homme .....                                   | Œstrone                         | Œstradiol-17 $\beta$            | Pearlman et coll. (1954 b)         |
| Femme enceinte ..                             | Œstrone                         | Œstradiol-17 $\beta$            | Pearlman et coll. (1954 b)         |
| Lapin .....                                   | Œstrone                         | Œstradiol-17 $\beta$            | Heugshem (1955)                    |
| Homme .....                                   | Œstrone                         | Œstriol                         | Pearlman et Pincus (1946)          |
| Femme enceinte ..                             | Œstrone                         | Œstriol                         | Pearlman et coll. (1954 b)         |
| Lapin .....                                   | Œstrone                         | Stéroïdes neutres               | Heugshem-Verly (1955)              |
| Homme .....                                   | Œstrone et œstradiol-17 $\beta$ | Métabolites non stéroïdes       | Beer et Gallagher (1955 a et b)    |
| Rat .....                                     | Œstrone et œstradiol-17 $\beta$ | Métabolites non stéroïdes       | Heugshem (1957)                    |
| Femme .....                                   | Œstradiol-17 $\beta$            | 16-céto-œstradiol-17 $\beta$    | Levitz et coll. (1956 b)           |
| Femme .....                                   | Œstradiol-17 $\beta$            | 16 $\beta$ -hydroxy-œstrone     | Brown et coll. (1958)              |
| Femme .....                                   | Œstrone                         | 16-céto-œstrone                 | Slaunwhite et Sandberg (1956)      |
| Femme .....                                   | Œstrone                         | 16-céto-œstrone                 | Migeon et coll. (1959)             |

TABLEAU II. — MÉTABOLISME INTERMÉDIAIRE DES ŒSTROGÈNES IN VIVO (suite).

| Sujet                    | Substance administrée                      | Produits isolés dans les urines                                                    | Auteurs                                |
|--------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| Homme .....              | 16-céto-œstradiol-17 $\beta$               | Œstriol                                                                            | Stimmel (1948)                         |
| Homme .....              | 16-céto-œstradiol-17 $\beta$               | Œstriol,<br>16-épi-œstriol                                                         | Beling, Breuer J.,<br>Breuer H. (1962) |
| Homme .....              | 16-céto-œstrone                            |                                                                                    |                                        |
| Femme .....              | 16 $\alpha$ -hydroxy-œstrone               | Œstriol                                                                            | Brown et Marrian (1957)                |
| Homme .....              | 16 $\alpha$ et 16 $\beta$ -hydroxy-œstrone | Œstriol<br>16-épi-œstriol<br>17-épi-œstriol<br>16,17-épi-œstriol                   | Nocke, Breuer et Knuppen (1961)        |
| Femme .....              | Œstriol                                    |                                                                                    |                                        |
|                          |                                            |                                                                                    |                                        |
| Femme .....              | Œstriol                                    | 16-céto-œstradiol-17 $\beta$<br>16-épi-œstriol                                     | Levitz et coll. (1958)                 |
| Homme .....              | Œstradiol-17 $\beta$                       | 2-méthoxy-œstrone                                                                  | Kraychy et Gallagher (1958)            |
| Homme .....              | Œstradiol-17 $\beta$                       | 2-méthoxy-œstriol                                                                  | Fishman et Gallagher (1958)            |
| Homme .....              | Œstradiol-17 $\beta$                       | 2-méthoxy-œstrone<br>2-hydroxy-œstrone                                             | Fishman (1963)                         |
| Femmes ménopausées ..... | 2-hydroxy-œstradiol-17 $\beta$             | 2-hydroxy-œstrone<br>2-hydroxy-œstriol<br>2-méthoxy-œstrone<br>2-méthoxy-œstradiol |                                        |
|                          |                                            |                                                                                    | Axelrod et coll. (1961)                |

*in vivo* et *in vitro* qui ont permis l'isolement de ces divers métabolites, et n'énoncer ici que des notions générales.

1° **Les réactions de déshydrogénation et d'hydrogénation.** — *L'interconversion de l'œstradiol-17- $\beta$  et de l'œstrone* est la mieux connue de toutes les réactions de ce genre.

Les expériences *in vitro* effectuées par Ryan et Engel (1953 b) ont montré que la 17 $\beta$ -ol-déshydrogénase catalysant la transformation réversible de l'œstradiol-17 $\beta$  en œstrone était très largement répandue dans les tissus humains. Cet enzyme, qui nécessite comme accepteur d'hydrogène la diphosphopyridine nucléotide, a été retrouvé dans tous les tissus où il a été recherché : foie, rein, cœur, poumons, cerveau, globules rouges, glande mammaire et placenta où il atteint la plus grande concentration.

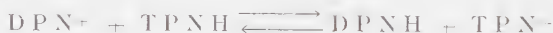
TABLEAU III. — MÉTABOLISME INTERMÉDIAIRE DES ŒSTROGÈNES IN VITRO.

| Tissu                                         | Substrat                         | Produit                                                                                                                      | Auteurs                                                  |
|-----------------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| Placenta humain.                              | Œstradiol-17 $\beta$             | Œstrone                                                                                                                      | Ryan et Engel (1953 b)                                   |
| Foie humain ....                              | Œstradiol-17 $\beta$             | Œstrone                                                                                                                      | Ryan et Engel (1953 b)                                   |
| Iléum humain ...                              | Œstradiol-17 $\beta$             | Œstrone                                                                                                                      | Ryan et Engel (1953 b)                                   |
| Testicules hum...                             | Œstrone                          | Œstradiol-17 $\beta$                                                                                                         | Ryan et Engel (1953 b)                                   |
| Placenta humain.                              | Œstradiol-17- $\beta$<br>Œstrone | Œstrone<br>Œstradiol-17 $\beta$                                                                                              | Levitz et coll. (1956 a)                                 |
| Placenta (homo-<br>généat) .....              | Œstradiol-17 $\beta$<br>Œstrone  | Œstrone<br>Œstradiol-17 $\beta$                                                                                              | Pearlman et coll.<br>(1954 a)                            |
| Sang .....                                    | Œstradiol-17 $\beta$<br>Œstrone  | Œstrone<br>Œstradiol-17- $\beta$                                                                                             | Brown et coll. (1961)                                    |
| Placenta humain<br>(perfusé) .....            | Œstradiol-17 $\beta$ -           | Œstrone, œstriol<br>2-méthoxy-œstrone<br>16-épi-œstriol                                                                      | Troën (1961)                                             |
| Foie de rat .....                             | Œstradiol-17 $\beta$             | Œstrone                                                                                                                      | Pearlman et coll.<br>(1949), Ryan et En-<br>gel (1953 a) |
| Foie de rat ....                              | Œstrone                          | Œstriol                                                                                                                      | Heugshem (1955), Ha-<br>gopian (1955).                   |
| Foie de rat ....                              | Œstrone                          | Œstradiol-17 $\alpha$                                                                                                        | Heugshem (1955)                                          |
| Foie de lapin ...                             | Œstrone                          | Œstradiol-17 $\alpha$                                                                                                        | Heugshem (1955)                                          |
| Foie de bœuf ...                              | Œstrone                          | Œstradiol-17 $\alpha$                                                                                                        | Levy (1956)                                              |
| Erythrocytes ....                             | Œstradiol-17 $\beta$<br>Œstrone  | Œstrone<br>Œstradiol-17 $\beta$                                                                                              | Gray et Bishoff (1955),<br>Repke et Markwardt<br>(1954)  |
| Foie fœtal .....                              | Œstradiol-17 $\beta$             | Œstriol, œstrone<br>6-hydroxy-œstra-<br>diol                                                                                 | Breuer et coll. (1960 b)                                 |
| Foie humain ...                               | 16 $\alpha$ -hydroxy-<br>œstrone | Œstriol<br>17-épi-œstriol                                                                                                    | Breuer et coll. (1958 a)                                 |
| Tranches foie et<br>ovaire humain.            | 16-céto-œstrone                  | 16 $\alpha$ -hydroxy-<br>œstrone<br>16-céto-œstradiol<br>œstriol,<br>16 et 17-épi-œstriol<br>16 $\beta$ -hydroxy-<br>œstrone | Breuer et coll. (1959 a)                                 |
| Tranches de foie<br>humain et de<br>rat ..... | 16 $\beta$ -hydroxy-<br>œstrone  | 16-céto-œstradiol-<br>17 $\beta$<br>16-épi-œstriol                                                                           | Breuer et coll. (1959 b)                                 |

TABLEAU III. — MÉTABOLISME INTERMÉDIAIRE DES ŒSTROGÈNES IN VITRO (suite).

| <i>Tissu</i>                                 | <i>Substrat</i>                 | <i>Produit</i>                                                 | <i>Auteurs</i>                     |
|----------------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| Tranches de foie de rat .....                | Œstradiol-17 $\beta$ et œstrone | 6-hydroxy-œstrone<br>6-hydroxy-œstradiol-17 $\beta$<br>Œstriol | Breuer et coll. (1960 c et 1961 a) |
| Foie fœtal .....                             | Œstradiol-17 $\beta$            | Œstriol, 16-épi-œstriol, œstrone et œstriol glucosiduronate    | Engel et coll. (1962)              |
| Tranches de foie de rat et de lapin .....    | Œstriol                         | 2-méthoxy-œstriol<br>2-hydroxy-œstriol                         | King (1961)                        |
| Homogénat de rein de rat ....                | Œstriol                         | 16-céto-œstradiol<br>16-épi-œstriol                            | King (1960)                        |
| Tranches de foie de rat et d'homme .....     | 2-hydroxy-œstradiol             | 2-méthoxy-œstradiol                                            | Breuer et coll. (1961 a)           |
| Testicule, ovaire et surrénale humains ..... | 2-hydroxy-œstradiol             | 2-méthoxy-œstradiol                                            | Axelrod et Goldzieher (1962)       |

Villee et collaborateurs ont également montré dans une série de travaux que l'hydrogénation ou la déshydrogénation du groupement oxygéné en C<sub>17</sub> peut être catalysée par une pyridine nucléotide transdéshydrogénase associant cette transformation à la réaction :



Cet enzyme, moins répandu que la 17 $\beta$ -ol-déshydrogénase, a cependant été retrouvé en plus du placenta dans l'endomètre, le myomètre, la glande mammaire et l'hypophyse (Villee, 1962).

Les dosages chimiques aussi bien que les études cinétiques ont par ailleurs montré que l'équilibre de ces réactions se produisait toujours en faveur d'une déshydrogénation de l'œstradiol en œstrone (Heugshem, 1959; Fishman, Bradlow, Gallagher, 1960) qui s'effectue avec une grande rapidité.

2° L'hydroxylation sur le carbone 2 est de connaissance récente.

La conversion *in vivo* de l'œstradiol-17 $\beta$  en 2-hydroxy-œstrone (Fishman et collaborateurs, 1960 b) a montré la présence de 2-hydroxylase dans l'organisme humain.

King (1961) a obtenu à partir de l'œstriol la formation de 2-hydroxy-œstriol et de 2-méthoxy-œstriol par des préparations de foie de rat et de lapin en présence d'oxygène, de D.P.N.H. ou d'un système générateur de T.P.N.H., d'A.T.P. et d'un dérivé de l'acide folique.

Il a pu localiser la 2-hydroxylase dans les microsomes et montrer son absence dans les homogénats de rein, d'ovaire et d'utérus.

L'hydroxylation sur le carbone 2 semble être une étape préalable nécessaire à la formation de *dérivés méthoxylés* (Breuer et collaborateurs, 1961 b).

Nous avons vu que ces 2-méthoxy-œstrogènes ont été isolés des urines au cours de la grossesse (Loke et Marrian, 1958; Frandsen, 1959), ou après injection d'œstradiol radio-actif (Kraychy et Gallagher, 1957; Fishman et Gallagher, 1958).

La formation des 2-méthoxy-œstrogènes se fait par l'intermédiaire d'une oxygène-méthyltransferase, la méthylation enzymatique s'effectuant seulement après addition de S-adenosyl-méthionine comme groupe donneur de méthyle à des préparations microsomiques de foie de rat (Breuer et collaborateurs, 1961 b).

Axelrod et Goldzieher (1962 b) obtinrent également la formation de 2-méthoxy-œstradiol-17 $\beta$  par transméthylation dans les tissus humains producteurs de stéroïdes : testicule, ovaire et surrénales en présence d'A.T.P. et de C<sup>14</sup>-méthyl-méthionine.

3° L'hydroxylation en 6 $\beta$  ou en 6 $\alpha$  des œstrogènes a été démontrée par Mueller et Rumney (1957), puis par Breur et collaborateurs (1959 c), après incubation d'œstrone ou d'œstradiol-17 $\beta$  avec des préparations de foie en présence de T.P.N.H. et d'oxygène.

Breur et collaborateurs (1961 a) ont pu également démontrer l'existence de 6 $\alpha$  et 6 $\beta$ -déshydrogénase dans le foie de rat et le foie fœtal humain. Ces recherches ont permis d'établir la figure 4.

4° L'hydroxylation sur le carbone 16 et le métabolisme des œstrogènes substitués en 16. — Le mécanisme exact par lequel l'œstriol s'élabore in vivo est encore ignoré. L'hydroxylation directe de l'œstradiol-17 $\beta$  en œstriol semble assez improbable. Plusieurs hypothèses ont été avancées, par Huffmann et Grollman (1947) puis par Marrian, Watson et Panattoni (1957 a). Les expériences in vivo énumérées dans le tableau II ont confirmé le rôle des œstrogènes substitués sur le carbone 16 : 16 $\alpha$  et 16 $\beta$ -hydroxy-œstrone, 16-céto-œstrone, 16-céto-œstradiol-17 $\beta$ , qui, nous l'avons vu, ont été identifiés dans les urines de femmes enceintes par Marrian et ses élèves.

Ce sont surtout les recherches effectuées par Breuer et ses collaborateurs par incubation in vitro du foie de rat ou d'homme qui ont permis l'établissement d'un schéma métabolique cohérent (fig. 5). A ce sujet, nous signalerons quelques points soulignés récemment par Breuer (1962 a et b).

L'homme possède une  $16\alpha$  aussi bien qu'une  $16\beta$ -hydroxylase qui ont été retrouvées dans le foie.

Il existe aussi  $16\alpha$  et  $16\beta$ -hydroxystéroïde-déshydrogénases ainsi que  $17\alpha$  et  $17\beta$ -hydroxystéroïde-déshydrogénases.

Quantitativement il semble que la formation de la  $16\alpha$ -hydroxy-œstrone et sa réduction en œstriol sont les réactions les plus importantes.

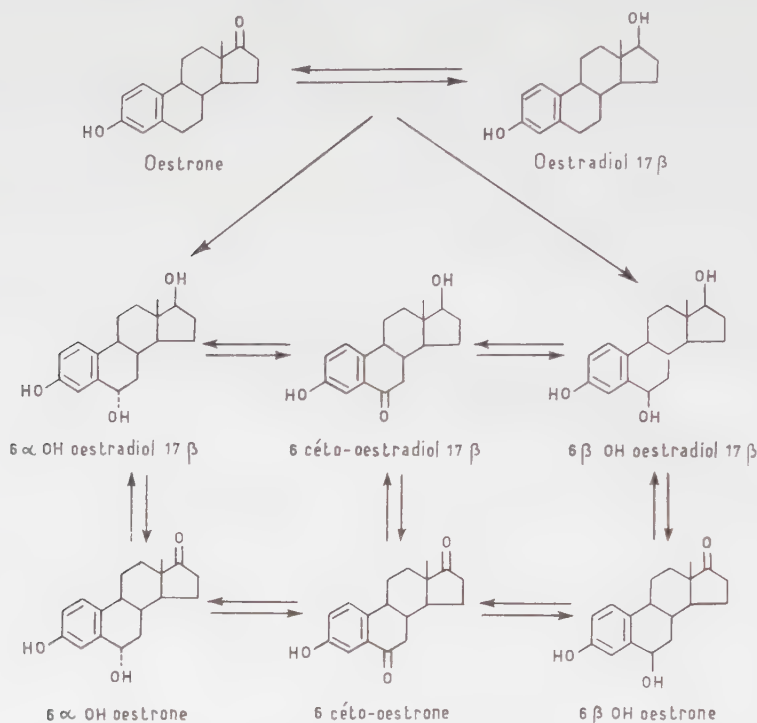


FIG. 4. — Métabolisme des œstrogènes substitués sur le carbone 6 à partir de l'œstradiol par le foie de rat ou de fœtus humain in vitro (d'après BREUER, KNUPPEN, PANGELS, 1960 b).

L'oxydation de l'œstriol en 16-cétœ-œstradiol-17 $\beta$  aussi bien que la transformation du  $16\beta$ -hydroxy-œstrone en 16-épi-œstriol sont également assez considérables, par contre la formation du 17-épi-œstriol et du 16-17-épi-œstriol n'ont pas quantitativement une grande importance.

La 16-cétœ-œstrone peut en outre être considérée comme le pivot central du métabolisme intermédiaire des œstrogènes substitués sur le carbone 16 (Breuer, 1962 b).

5° Une hydroxylation sur le carbone 18 de l'œstrone a pu d'autre part être observée avec des homogénats de surrénale de bœuf (Loke et collabo-

rateurs, 1957) et Breuer et Knuppen (1962 in Breuer, 1962 b) ont montré récemment qu'une  $11\beta$ -hydroxylation de l'œstrone est possible dans le cortex surrénal. Avec des tranches de foie de rat, ces auteurs ont en outre trouvé que  $11\beta$ -hydroxy-œstrone et  $11\beta$ -hydroxy-œstradiol sont rapidement interconvertibles et toutes deux transformables en dérivés cétoniques.

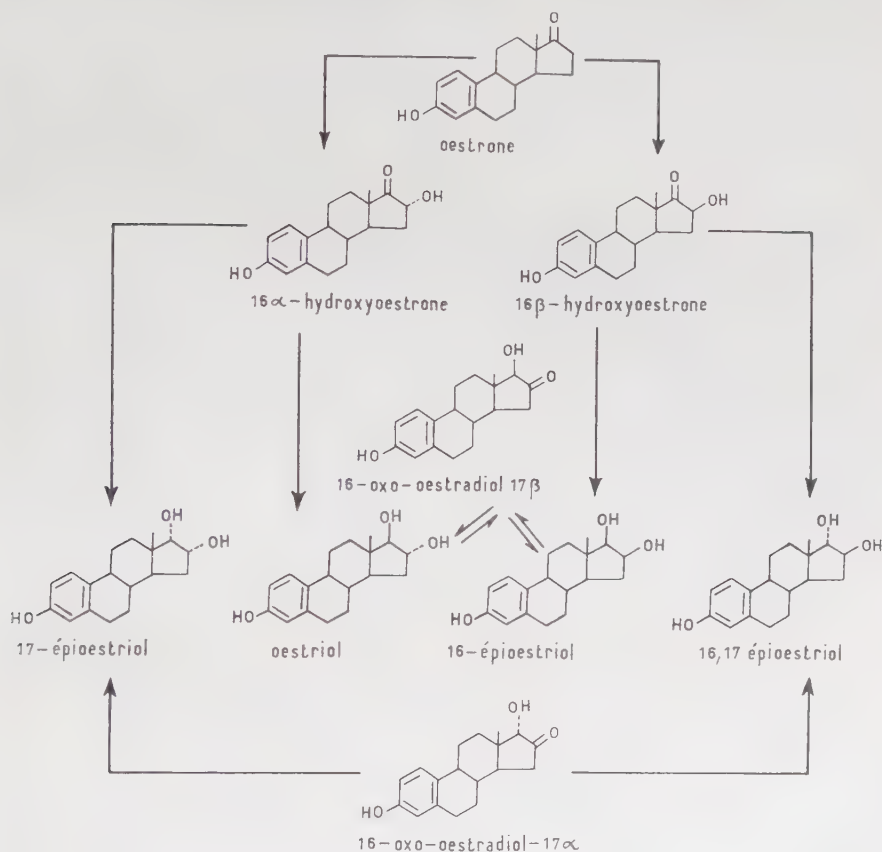


FIG. 5. — Métabolisme intermédiaire des œstrogènes substitués sur le carbone 16, chez l'homme (d'après BREUER, 1962 b).

Toutes ces réactions ont été observées chez l'homme, *in vitro*; et *in vivo* avec des tissus humains.

c) **En conclusion.** — Il existe encore de nombreuses lacunes dans nos connaissances sur le métabolisme de l'œstrone et de l'œstradiol dans l'organisme humain. Il nous semble cependant que le schéma récapitulatif qu'a établi récemment Adlercreutz (fig. 5 bis) résume les diverses données expérimentales d'une manière simple et cohérente.

On ne sait malheureusement pas encore la signification physiologique de ces transformations. Un certain nombre d'entre elles et en particulier

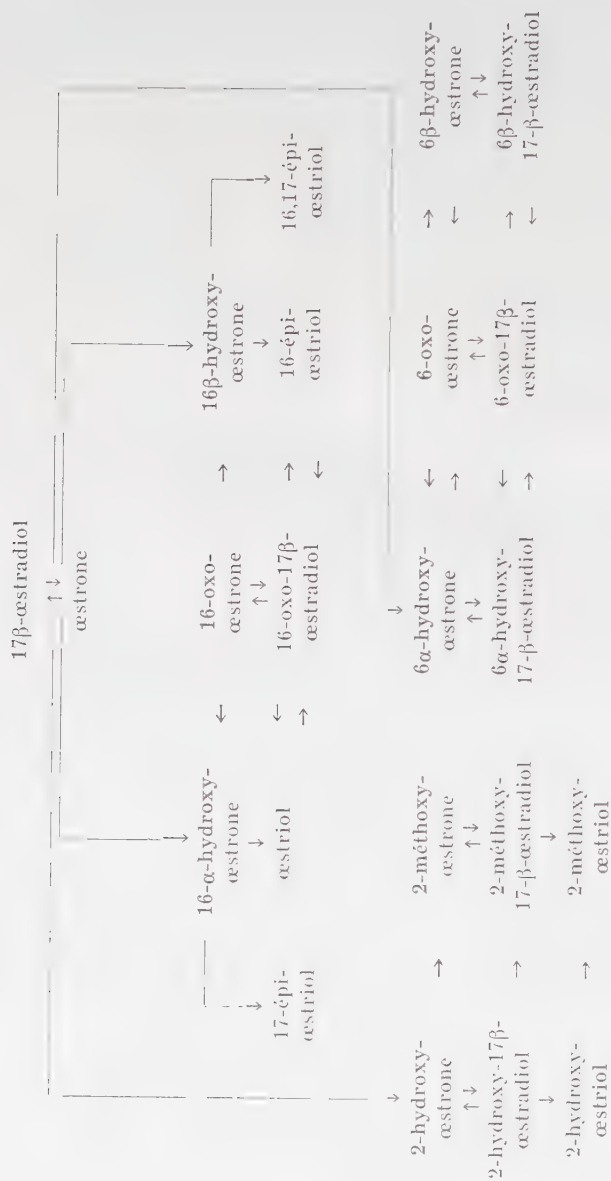


Fig. 5 bis. — Schéma du métabolisme du 17 $\beta$ -œstradiol et de l'œstrone dans l'organisme humain établi d'après les expériences effectuées in vivo et in vitro (in ADLERCREITZ, 1963).

l'hydroxylation sur le carbone 2 ou la méthylation du groupement 2-hydroxyle semblent être surtout un mécanisme d'inactivation. De même on peut penser que la très faible solubilité des 6 $\alpha$ -hydroxy-œstrogènes en modifie les propriétés physiologiques.

## V. — CONJUGAISON DES ŒSTROGÈNES AUX ACIDES SULFURIQUE ET GLUCURONIQUE

Les œstrogènes et leurs métabolites stéroïdiques sont dans leur quasi-totalité conjugués dans l'organisme aux acides sulfurique et glucuronique. Cette liaison chimique augmente leur solubilité dans l'eau, ce qui facilite leur transport, et surtout leur élimination dans les urines.

Dès 1929, Glimm et Wadehn établirent que les œstrogènes urinaires ne sont pas extractibles directement par les solvants organiques. On a cru pendant longtemps que l'œstrone s'éliminait essentiellement sous forme de sulfate (Schachter et Marrian, 1938; Jensen et collaborateurs, 1945) et l'œstriol comme glucosiduronate (Cohen et Marrian, 1936), mais cette classification s'est ultérieurement révélée trop succincte et les méthodes nouvelles d'hydrolyse enzymatique spécifique ont permis à Cohen et Bates (1949), Oneson et Cohen (1952), Heugshem (1957) d'établir que l'œstrone, l'œstradiol et l'œstriol peuvent être liés à l'acide glucuronique aussi bien qu'à l'acide sulfurique.

### *Nature et mode de formation des œstrogènes conjugués* (fig. 6)

**1° Les glucosiduronates.** — Les phénolstéroïdes se condensent avec l'hydroxyle semi-acétalique de l'acide glucuronique par une liaison glucosidique. La commission de nomenclature de la Chemical Society (1953) a adopté pour ces conjugués la dénomination de glucosiduronates de stéroïdes. En France l'ancienne dénomination de glucuronides reste couramment employée.

Pour l'œstrone, la liaison ne peut avoir lieu que sur le groupe hydroxylé en C<sup>3</sup>. Pour l'œstriol, la liaison glucosidique est le plus souvent en 16 ou 17; on sait en effet que l'hydroxyle phénolique en C<sup>3</sup> est habituellement encore libre.

Carpenter et Kellie (1961) ont pu identifier les deux monoglucosiduronates en C<sup>16</sup> et en C<sup>17</sup> de l'œstriol dans l'urine de femmes enceintes et plus récemment Hashimoto et Neeman (1963) ont pu isoler l'acide œstriol-16 $\alpha$ -glucosiduronique dans ce milieu.

Diczfalusy et collaborateurs (1961 a, 1962) ont également pu mettre en évidence des di ou tri-glucosiduronates après injection d'œstriol dans les anses intestinales isolées.

La formation des glucuronides s'effectue par le transfert sur le stéroïde de la copule glucuronique d'un acide uridine di-phospho-glucuronique avec libération d'uridine diphosphate. Ce transfert est catalysé par une glucuro-

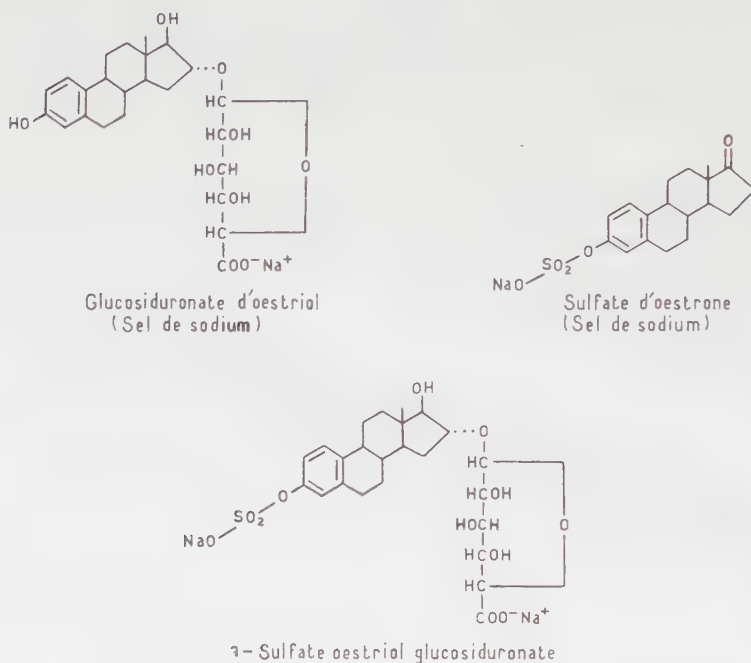


FIG. 6. — Structure de quelques œstrogènes conjugués (in DICZFALUSY et LAURITZEN, 1961).

nosyl-transferase qui a été trouvée dans les microsomes des cellules hépatiques, noyaux et mitochondries étant beaucoup moins actifs (Dutton et Storey, 1954; Strominger et collaborateurs, 1954; Smith et Breuer in Breuer, 1962 b).

**2° Les sulfates.** — Le sulfate d'œstrone isolé par Schachter et Marrian (1938) dans l'urine de jument gravide est longtemps resté le seul ester sulfurique connu.

Cohen et Bates (1949) ont conclu d'expériences effectuées avec la mylase P que la liaison ester se fait avec le groupe hydroxyle en C<sup>3</sup>.

Les sulfates d'œstrone (Mac Kenna et collaborateurs, 1961) et d'œstriol (Adlercreutz et Beling in Breuer, 1962 b) ont été isolés des urines de femmes enceintes.

Le sulfate d'œstrone semble être une forme importante de transport des œstrogènes dans le plasma humain (Purdy et collaborateurs, 1961). Mais plus récemment Touchstone et Murawec (1963) ont isolé également du sulfate d'œstriol et d'œstradiol dans le sang des femmes enceintes et dans le sang du cordon.

La formation des œstrogènes sulfates a été observée *in vitro* aussi bien que lors d'expériences de perfusion.

De Meio et collaborateurs (1958) ont obtenu la fixation de l'ion sulfate sur l'œstrone et sur l'œstradiol par la fraction surnageante de préparations de foie de rat et de bœuf en présence d'A.T.P. et d'ions magnésium. On peut penser que les œstrogènes sulfates se forment de la même manière que les autres esters sulfates par transfert d'un sulfate actif sur un groupement phénol par un groupe complexe d'enzymes.

### *Lieux de formation* (tableau IV)

1° On attribue depuis longtemps au **parenchyme hépatique** la responsabilité des processus de conjugaison.

Crepy (1947), Heugshem (1957), Sie et Fishman (1957) ont démontré sans conteste la formation de glucosiduronate d'œstradiol par les foies de lapins et de rats *in vitro*. Diczfalusy et collaborateurs (1961 b), Engel et collaborateurs (1962) ont prouvé que le foie des fœtus humains avait la même propriété.

L'identification par Adlercreutz (1962) de sulfate et de glucosiduronate d'œstrone et d'œstradiol et surtout de glucosiduronate d'œstriol (90 %) dans la bile de femme enceinte confirme le rôle important du foie dans les processus de conjugaison.

2° Le **tractus digestif** et surtout la muqueuse de l'intestin grêle et du duodénum possèdent également une activité de conjugaison. Hartiala et collaborateurs ont constaté chez le rat que la muqueuse duodénale *in vitro* avait la possibilité de transformer en glucuronide 53 % de l'œstradiol ajouté (Lehtinen et collaborateurs, 1958).

Chez l'homme, Diczfalusy et collaborateurs (1961 a) ont pu identifier des glucosiduronates d'œstriol dans le sang veineux efférent après injection d'œstriol dans une anse intestinale isolée.

En 1962, ils obtinrent par la même technique, après administration d'œstradiol, de l'œstrone-3-glucosiduronate et du  $17\beta$ -œstradiol-3-glucosiduronate.

3° Il n'est pas exclu que d'autres organes tels le **poumon et la rate** (Schachter et collaborateurs, 1959) puissent contribuer chez l'adulte aux processus de conjugaison. L'utérus par contre est inactif (Hartiala, 1955). Sneddon et Marrian (1963) ont enfin constaté la formation de sulfate

TABLEAU IV. — PRINCIPAUX ŒSTROGÈNES CONJUGUÉS ISOLÉS.

| <i>Lieu d'isolement</i>             | <i>Nature du conjugué</i>                                                                                                                                                                              | <i>Auteurs</i>                                              |
|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Urines de grossesse humaine .....   | Œstriol glucosiduronate                                                                                                                                                                                | Cohen et Marrian (1936)<br>Jensen, Larivière et Elie (1945) |
| Urines d'étalon .....               | Œstrone sulfate                                                                                                                                                                                        |                                                             |
| Urines de jument gravide .....      | Œstrone sulfate                                                                                                                                                                                        | Schachter et Marrian (1938)                                 |
| Urines de grossesse humaine .....   | Œstrone glucosiduronate                                                                                                                                                                                | Oneson et Cohen (1952)                                      |
| Urines de grossesse humaine .....   | Œstrone sulfate                                                                                                                                                                                        | Mc Kenna, Menini et Norymberski (1961)                      |
| Urines de grossesse humaine .....   | Œstriol glucosiduronate (C <sub>16</sub> et C <sub>17</sub> )                                                                                                                                          | Carpenter et Kellie (1962)                                  |
| Urines de grossesse humaine .....   | Œstriol-3-glucosiduronate                                                                                                                                                                              | Beling (1963)                                               |
|                                     | Œstriol-16 (17?)-glucosiduronate                                                                                                                                                                       |                                                             |
| Méconium .....                      | Œstriol-16 (17?)-glucosiduronate                                                                                                                                                                       | Menini et Diczfalusy (1960)                                 |
| Fistule biliaire .....              | Œstriol-16 (17?)-glucosiduronate                                                                                                                                                                       | Diczfalusy et coll. (1961)                                  |
| Bile humaine .....                  | Œstrone sulfate, œstriol sulfate, œstrone glucosiduronate                                                                                                                                              | Adlercreutz (1963)                                          |
|                                     | Œstradiol glucosiduronate et sulfate et surtout œstriol glucosiduronate (90 %)                                                                                                                         |                                                             |
| Plasma humain .....                 | Œstrone sulfate, plus accessoirement œstrone glucosiduronate                                                                                                                                           | Purdy, Engel et Oncley (1961)                               |
| Sang humain pendant grossesse ..... | Œstriol-3-sulfate 25 %, glucosiduronate 31 % et sulfo-glucosiduronate 44 %                                                                                                                             | Touchstone, Greene et coll. (1963)                          |
|                                     | Œstriol-3-sulfate (86 % de l'œstriol conjugué), plus accessoirement : glucosiduronate sodique d'œstriol, présence probable d'œstriol-3-sulfate-16, 17-glucosiduronate ou d'œstriol-3-sulfo-glucuronide |                                                             |
| Sang du cordon .....                |                                                                                                                                                                                                        | Troën et Diczfalusy (1961)                                  |
| Sang du cordon .....                | Œstriol sulfate 70 %, glucosiduronate 24 %                                                                                                                                                             | Touchstone, Greene et coll. (1963)                          |

TABLEAU IV. — PRINCIPAUX ŒSTROGÈNES CONJUGUÉS ISOLÉS (suite).

| Lieu d'isolement                              | Nature du conjugué                                                                                                        | Auteurs                                      |
|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Liquide amniotique et urine du nouveau-né.    | Œstriol-16 (17?)-glucosiduronate (51 % de l'œstriol conjugué), plus accessoirement œstriol-3-sulfate et pluriconjugués    | Troën et Diczfalusy (1961)                   |
| Anse intestinale isolée.                      | Œstriol → sodium.œstriol-16 (17?)-glucosiduronate + di ou tri-glucosiduronate                                             | Diczfalusy et coll. (1961 a)                 |
| Anse intestinale isolée.                      | Œstradiol → œstrone-3-glucosiduronate et 17 $\beta$ -œstradiol-3-glucosiduronate                                          | Diczfalusy et coll. (1962)                   |
| Placenta humain perfusé <i>in vivo</i> .....  | Œstriol-3-sulfate 80 %, œstriol-16 ou 17-glucosiduronate (10 %)                                                           | Diczfalusy (1962 a)                          |
| Placenta humain perfusé <i>in vitro</i> ..... | Œstriol → œstriol-3-sulfate                                                                                               | De Miquel N., Alonso C., Troën P. (1963)     |
| Foie fœtal <i>in vitro</i> ....               | Œstradiol → œstriol glucosiduronate                                                                                       | Engel et coll. (1962)                        |
| Fœtus perfusés <i>in vitro</i> .              | Œstriol-3-sulfate (90 %), œstriol-16 ou 17-glucosiduronate (5 %) + sulfo-glucuronide                                      | Mikhaïl, Wiqvist et Diczfalusy (1963 a et b) |
| Fœtus perfusés <i>in vitro</i> .              | Œstradiol → surtout œstradiol et œstrone sulfate                                                                          | Haynes et coll. (1964)                       |
|                                               | Œstriol → dans le sang :<br>œstriol-3-sulfate (75 %) -<br>œstriol-3-sulfate (16-17 ?)<br>- glucosiduronate 20 %           | Diczfalusy et coll. (1964)                   |
| Anencéphale <i>in vivo</i> ...                | dans les urines : œstriol glucosiduronate 50 % - œstriol sulfate 16 % et œstriol-3-sulfate 16-17 % - glucosiduronate 25 % |                                              |
| Microsomes de foie de lapin .....             | Œstrone → œstrone mono-glucosiduronate                                                                                    | Smith et Breuer, in Breuer (1962 b)          |
| Surnageant de foie de rat et de bœuf .....    | Œstrone et œstradiol sulfate en présence d'A.T.P. et ion Mg                                                               | De Meio et coll. (1958)                      |
| Tranches de surrénales de bœuf .....          | Œstrone → œstrone sulfate                                                                                                 | Sneddon et Marrian (1963)                    |

d'œstrone après incubation de tranches de surrénales de bœuf avec  $16\text{ }^{14}\text{C}$ -œstrone.

4° **C'est surtout chez le fœtus** que les divers tissus ont une activité de conjugaison importante.

Diczfalusy et ses collaborateurs étudient depuis plusieurs années *in vivo* comme *in vitro* le rôle du fœtus et du nouveau-né dans le métabolisme des œstrogènes (1961 b) (1963 a et b).

Ils ont dosé les œstrogènes tissulaires après injection d'œstrogènes à la mère, au fœtus ou dans le liquide amniotique. Ils ont incubé *in vitro* différents tissus fœtaux avec des œstrogènes, et enfin ils ont effectué des perfusions de fœtus avec du sang contenant des œstrogènes libres radio-actifs ou non. Cet ensemble d'expériences leur a permis d'établir que le fœtus humain est capable de conjuguer les œstrogènes et surtout l'œstriol dès le deuxième ou le troisième mois de la gestation. Le principal conjugué formé est l'œstriol-3-sulfate (90 % des substances conjuguées après perfusion du fœtus avec  $4\text{ }^{14}\text{C}$ -œstriol), il existe également 5 % de sodium œstriol-16 (17?)-glucosiduronate. Ce dernier composé est retrouvé presque exclusivement dans les extraits de foie, le tractus digestif et le liquide de perfusion. L'existence d'un double conjugué sulfo-glucosiduronate est en outre très probable (Mikhaïl, Wiquist et Diczfalusy, 1963 a).

5° **Le rôle du placenta** dans les processus de conjugaison a été longtemps considéré comme nul ou négligeable. Levitz et collaborateurs (1960) ont cependant pu montrer que le placenta de cobaye perfusé *in vitro* était capable de sulfo-conjuguer l'œstrone et l'œstradiol radio-actif.

Plus récemment de Miquel, Alonso et Troën (1963) ont pu démontrer la sulfurylation du  $\text{C}^{14}$ -œstriol par le placenta humain perfusé *in vitro*.

En fait, il semble que les processus de conjugaison sont peu importants au niveau du placenta. Nous n'avons personnellement jamais pu observer d'augmentation considérable des œstrogènes conjugués au cours des diverses expériences de perfusion de placenta *in vitro* que nous avons effectuées, même en cas de production importante d'œstrogènes libres.

Diczfalusy pense actuellement que l'œstriol sécrété par le placenta sous forme libre arrive au fœtus qui le transforme essentiellement en sodium-œstriol-3-sulfate, et plus accessoirement en œstriol-16 (17?)-glucosiduronate et en double conjugué sulfo-glucosiduronate.

Il a d'ailleurs pu récemment prouver l'importance et la rapidité de ces processus de glycu- et surtout de sulfo-conjugaison de l'œstriol-16  $\text{C}^{14}$  chez un nouveau-né anencéphale (Diczfalusy, Barr et Lind, 1964), alors qu'ils semblent beaucoup plus lents chez la femme enceinte (Wilson, Eriksson, Diczfalusy, 1964).

Le sort de l'œstriol-3-sulfate a été étudié récemment par Mikhaïl, Wiquist et Diczfalusy (1963 b) qui ont pu constater qu'il était hydrolysé partiellement en œstriol par le placenta perfusé *in situ*.

Il semble effectivement que le placenta possède la capacité d'hydrolyser les stéroïdes conjugués de façon très efficace. Il contient en abondance une  $\beta$ -glucuronidase (Fishman, 1955) et des sulfatases. Pulkkinen (1961) a en effet constaté dans les extraits placentaires la présence d'une stéroïde-sulfatase, très active en particulier sur le sulfate d'œstrone, alors qu'il n'en trouvait pas trace dans les tissus fœtaux.

### *Conclusion*

On ignore encore actuellement le rôle exact de ces processus de conjugaison. On les a longtemps assimilés à une désactivation, mais cette opinion semble actuellement erronée car le glucosiduronate d'œstriol, par exemple, moins actif que le stéroïde libre par voie sous-cutanée, est dix fois plus actif que le stéroïde libre par voie orale (Odell, Skill, Marrian, 1937), de même que le sulfate d'œstrone est deux fois plus actif par voie orale que le stéroïde libre.

L'état libre ou conjugué des œstrogènes a certainement une signification physiologique très importante; on sait en effet que les glucuronides ne passent pas la barrière placentaire au contraire des œstrogènes libres (Dancis, Money, Condon et Levitz, 1958). Le sulfate sodique d'œstrone radio-actif injecté à la mère ne passe pas non plus du côté fœtal (Levitz et collaborateurs, 1960).

De même au cours de la grossesse, et nous y reviendrons ultérieurement, c'est, semble-t-il, l'hydrolyse du sulfate de dehydroépiandrostérone, par le placenta qui joue un rôle limitatif dans la biosynthèse des œstrogènes (Bolté et collaborateurs, 1964 a, b, c).

La conjugaison des œstrogènes facilite par ailleurs leur élimination urinaire en augmentant leur solubilité dans l'eau, mais la nature de l'acide conjugué exerce probablement une influence sur la clearance rénale, les glucosiduronates étant très peu réabsorbés par les tubules rénaux au contraire des sulfates (Diczfalusy et Lauritzen, 1961).

On ne sait pas à l'heure actuelle si les transformations intermédiaires des œstrogènes s'effectuent sur la molécule stéroïdique isolée ou conjuguée. On ignore également la façon dont les œstrogènes conjugués sont ultérieurement hydrolysés au niveau cellulaire.

On peut penser que la  $\beta$ -glucuronidase et la stéroïde-sulfatase existant dans les divers tissus et surtout dans le foie jouent un rôle important dans cette hydrolyse.

## VI. — FORMES DE TRANSPORT ET DISTRIBUTION DANS L'ORGANISME

### *Formes de transport*

Les œstrogènes circulant dans le sang sont la résultante d'un équilibre entre la sécrétion des hormones par les glandes endocrines d'une part et leur utilisation ou leur dégradation métabolique par les tissus récepteurs ainsi que leur issue hors de l'organisme par les voies excrétrices d'autre part.

Nos connaissances sur le comportement des œstrogènes pendant leur transport dans le sang sont très minces.

On a pensé tout d'abord qu'ils étaient essentiellement dissous dans le plasma. Mais déjà Albrieux (1941) par dosage biologique avait trouvé à peu près autant d'œstrogènes dans les globules rouges de femme enceinte que dans le sérum.

Plus récemment, Sandberg et Slaunwhite (1957) ainsi que Wall et Migeon (1959), grâce à l'administration d'œstrogènes marqués, ont montré qu'une grande partie de la radio-activité (14 à 32 % pour Migeon et collaborateurs) était retrouvée dans les globules rouges.

Bischoff et Bryson (1960) purent par ailleurs prouver qu'*in vitro* l'œstrone et l'œstradiol pénètrent dans les érythrocytes humains en traversant leur membrane et ne sont pas simplement fixés à leur surface.

Cependant en 1963 Maner et collaborateurs, Touschstone, Greene et collaborateurs, ainsi que Schwes (1964), constatèrent l'absence d'œstrogènes dans les hématies au cours de la grossesse et attribuèrent les résultats antérieurs aux conditions d'incubation *in vitro*.

Ainsi que nous l'avons vu précédemment, les œstrogènes ne restent pas dans le sang sous forme libre mais sont pour la plupart conjugués aux acides sulfurique et glucuronique, probablement par passage à travers le foie dont le rôle semble ici fondamental.

Les œstrogènes sont d'autre part fixés aux protéines du sang, comme le montre le fait que le résidu, après précipitation par l'alcool, est très riche en œstrogènes.

Ryan et Engel (1956) ont également montré que le sulfate d'œstrone perfusé par voie intraveineuse était rapidement fixé aux protéines car la majeure partie des œstrogènes était récupérée sous forme dialysable et insoluble dans le chloroforme.

De nombreuses recherches ont été effectuées au sujet de ces liaisons entre œstrogènes et protéines, en particulier par Szego et Roberts. Ces

auteurs ainsi que Oncley et Gurd (1953) ont montré que l'œstriol était lié aux lipoprotéines  $\beta$  (fraction III de Cohn).

Sandberg, Slaunwhite et Antoniadès (1957-1961) ont montré par l'emploi de stéroïdes radio-actifs que la majeure partie des œstrogènes libres et conjugués et de leurs métabolites était liée aux fractions plasmatiques IV<sub>1</sub> et V (albumine) et non à la fraction III<sub>0</sub>.

Bischoff et collaborateurs (1957-1958) pensent également à une liaison des œstrogènes à l'albumine, cette substance étant pour eux liée à 90 % des œstrogènes plasmatiques.

Purdy et collaborateurs (1959) ont eux aussi constaté que deux heures après addition de (16 <sup>14</sup>C)-17 $\beta$ -œstradiol le sulfate d'œstrone radio-actif se trouvait dans les fractions IV<sub>1</sub> de Cohn.

Plus récemment, Martin (1963) a constaté qu'au cours de la grossesse toutes les fractions sériques contenaient de l'œstrone et de l'œstriol liés, mais surtout les  $\beta$ -globulines, et qu' $\alpha$  et  $\beta$ -globulines contenaient tout l'œstradiol lié.

Ces résultats sont malheureusement encore insuffisants et contradictoires et il est difficile d'en tirer des conclusions formelles à l'heure actuelle.

Ces contradictions peuvent être dues au fait qu'il ne s'agit pas de liaison chimique véritable mais de liaison physique très faible et réversible, reposant sur des phénomènes d'adsorption, d'électrovalence ou de solubilité dans les solutions protéiques.

Les différences entre les résultats obtenus peuvent d'autre part dépendre de la technique d'extraction employée; en effet, Diczfalussy et Magnusson (1958) ne purent isoler aucun œstrogène lié aux protéines dans le plasma, le tissu de foie fœtal ou le sang de cordon ombilical, alors que Roy et Brown (1957) par une autre méthode d'extraction en trouvaient dans ce liquide.

On a pu par ailleurs récemment synthétiser des liaisons œstro-protéines. Ces conjugués ont une activité antigénique chez le lapin et Erlanger et Lieberman (1959) ont pu constater qu'au moins vingt molécules d'œstrone-17(O-carboxy-méthyl) oxime sont liées par covalence à une molécule d'albumine bovine sérique au niveau de 20 des 60 groupements NH<sub>2</sub> de la molécule protéique.

De telles recherches ouvrent la voie à la mesure sérologique des œstrogènes, mais il faut naturellement prouver que des liaisons analogues se produisent dans l'organisme humain.

Il est d'autant plus nécessaire d'éclaircir le problème de la liaison œstrogènes-protéines qu'il ne s'agit pas d'un simple mode de transport. En effet, la liaison aux protéines inhibe la diffusion des stéroïdes à travers les membranes cellulaires et par suite l'influence hormonale sur la cellule. Elle rend d'autre part impossible la filtration par les glomérules rénaux.

On peut considérer que les œstro-protéines doivent être en équilibre avec l'hormone non liée et par suite active, de manière semblable à ce

qui se passe entre les corticostéroïdes plasmatiques et la transcortine, les œstrogènes liés aux protéines constituant une réserve d'hormones inactives mais facilement et rapidement disponibles.

### *Distribution dans l'organisme et destin métabolique*

**1° Les œstrogènes administrés à l'homme sont métabolisés de façon extrêmement rapide.** — Pearlman (1957) a calculé que le temps de « turn-over », c'est-à-dire le temps nécessaire pour le remplacement de l'hormone circulante par un produit frais venant de la glande endocrine, est d'environ 6 minutes.

Heugshem (1957) a constaté qu'après injection d'œstrone  $16^{14}\text{C}$  dans la circulation du lapin, plus de 95 % de cette hormone disparaissait en l'espace de 2 à 3 minutes.

Fishman et collaborateurs (1960 a) ont observé une très rapide oxydation de l'œstradiol en œstrone *in vivo* (peut-être par l'œstronase des érythrocytes décrite par Bischoff et collaborateurs). En effet, après injection à plusieurs femmes d'un mélange en proportions variables d'œstrone ( $16^{14}\text{C}$ ) et d'œstradiol- $17\beta$  marqué au tritium, ils constatèrent que, dans les premiers échantillons de sang et d'urine analysés, 90 % au moins du tritium injecté sous forme d'œstradiol est retrouvé dans les molécules d'œstrone, et que la composition isotopique des autres métabolites œstrogéniques isolés se rapproche beaucoup plus de celle de l'œstrone que de celle de l'œstradiol. Ils considèrent donc que l'œstrone est le précurseur immédiat de l'œstriol. Ultérieurement, Fishman et collaborateurs (1962) constatèrent que le métabolisme de l'œstradiol administré par voie intraveineuse est identique chez la femme enceinte ou non gravide. Confirmant ainsi les résultats antérieurs de Pearlman (1954 b), ils purent en outre tirer de ces expériences des conclusions sur la biosynthèse de l'œstriol par une voie métabolique différente sur laquelle nous reviendrons ultérieurement.

Sandberg et Slaunwhite (1957) ont établi que les métabolites conjugués de l'œstrone- $^{14}\text{C}$  et de l'œstradiol- $^{14}\text{C}$  injectés atteignent dans le sang circulant leur concentration maximum 15 à 30 minutes après l'administration des œstrogènes radio-actifs et que l'augmentation persiste trois jours.

**2° Catabolisme et voies d'excrétion.** — Pour l'étude du catabolisme des œstrogènes, on peut difficilement tenir compte des expériences entreprises avec des œstrogènes marqués chez l'animal, car il existe selon les espèces des différences importantes dans les stéroïdes éliminés aussi bien que dans les voies d'excrétion.

Ces différences rendent aléatoire toute extrapolation à l'homme des résultats obtenus avec des animaux de laboratoire.

Fishman, Gallagher et collaborateurs ont, de 1955 à 1962, effectué une série de recherches intéressantes sur le sort des œstrogènes dans l'orga-

nisme. Après avoir administré de faibles doses d'œstradiol ou d'œstrone-16-C<sup>14</sup> à des sujets humains, ils ont mesuré la radio-activité dans les urines, les matières fécales et la bile (fig. 7).

Confirmant les résultats des chercheurs antérieurs, ils ont constaté que les produits métaboliques de l'œstrone et de l'œstradiol sont identiques, témoignant de la rapide interconvertibilité de ces deux corps dans l'organisme.

Nous avons vu précédemment que l'œstrone et l'œstradiol sont métabolisés en une série de stéroïdes qui sont conjugués aux acides sulfurique et glucuronique, et éliminés par les voies excrétrices. 65 % de la radio-activité administrée est récupérée dans les urines et 10 % dans les matières fécales (Beer et Gallagher, 1955 a et b).

Approximativement 25 % de la quantité administrée n'est pas retrouvée.

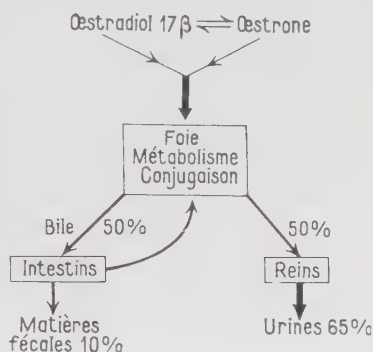


FIG. 7. — Métabolisme de l'œstradiol et de l'œstrone (d'après BROWN, FISHMAN, HELLMAN et GALLAGHER, 1959).

a) **Élimination urinaire** — Gallagher et collaborateurs ont constaté que 75 % seulement de la radio-activité éliminée dans les urines est récupérée dans la fraction neutre et phénolique où ils purent ultérieurement isoler un grand nombre de dérivés hydroxylés ou méthoxylés dont nous avons déjà parlé (Brown, Fishman, Gallagher, 1958).

25 % de la radio-activité des urines ne peut être récupérée, même par extraction à l'éther après hydrolyse acide ou enzymatique.

On peut donc penser que la dégradation des œstrogènes est très poussée puisque la plus grande partie de la radio-activité est retrouvée dans la fraction non phénolique, voire même non stéroïdique.

On ne sait en fait pas très exactement si des substances non stéroïdiques existent parmi les métabolites urinaires non identifiés restant solubles dans l'eau après hydrolyse.

Dans ce dernier groupe, il peut également s'agir de dérivés polyhydroxylés, méthoxylés, acides ou neutres des œstrogènes déjà connus, dérivés que l'on peut espérer voir identifier bientôt, étant donné les énormes progrès réalisés ces dernières années.

b) On sait peu de choses sur les œstrogènes éliminés dans les selles (10 % de la radio-activité injectée en moyenne). Menini et Diczfalussy (1960) ont isolé du méconium de l'œstriol-16 (17?)-glucosiduronate.

c) Quant à la **partie non retrouvée** des œstrogènes radio-actifs administrés (25 %), il peut s'agir de pertes techniques, mais plus probablement d'une élimination retardée, trop lente pour avoir été décelée, de l'utilisation anabo-

lique de fragments résultant du catabolisme ou de la formation de dépôts dans le foie (Albert et collaborateurs, 1949), le tractus digestif (Leblond, 1952) ou le tissu graisseux.

3° *Cycle entéro-hépatique.* — L'expérimentation effectuée chez les sujets porteurs de fistule biliaire a montré d'autre part qu'environ 50 % de la radio-activité administrée à ces patients était excrétée dans la bile au cours des premières douze heures et 50 % dans l'urine (Brown, Fishman, Hellman, Gallagher, 1959).

Or, comme nous l'avons vu, 10 % seulement sont retrouvés dans les matières fécales chez le sujet normal et 65 % dans les urines. Ces expériences complètent un grand nombre d'observations antérieures sur la distribution et la nature des œstrogènes dans la bile, les selles, les urines, le sang et sur les activités enzymatiques du foie, de l'intestin grêle et de la flore intestinale. Elles permettent de considérer comme bien établie l'hypothèse de la circulation entéro-hépatique des œstrogènes (Cantarow et collaborateurs, 1943). La moitié au moins des œstrogènes circulant est éliminée sous forme conjuguée dans la bile (Sandberg et Slaunwhite, 1957; Adlercreutz, 1962). Une petite partie d'entre eux s'élimine par les selles, mais la plus grande partie est réabsorbée par la muqueuse intestinale, ramenée au foie par le système porte et éliminée ensuite par les urines ou par la bile, s'exposant ainsi plusieurs fois aux systèmes enzymatiques hépatiques.

On sait peu de chose sur les modalités exactes de ces processus, en particulier s'il existe des hydrolyses et des conjugaisons successives dans le cycle entéro-hépatique. Ce phénomène est d'ailleurs probable : seules les stéroïdes libres peuvent être réabsorbés par la muqueuse intestinale.

La flore intestinale humaine joue probablement dans ces phénomènes un rôle important au même titre que la muqueuse de l'intestin grêle et du duodénum.

### *Conclusion*

En regrettant l'existence de nombreux points obscurs, nous concluons cette brève revue sur les constatations suivantes :

- le métabolisme et l'élimination des œstrogènes sont très rapides;
- les transformations chimiques sont très importantes et, seule, une petite partie des produits d'élimination conserve les caractéristiques chimiques des hormones initiales.

Nous soulignerons enfin le rôle prépondérant du foie, capable :

- de modifier les œstrogènes initiaux (métabolisme intermédiaire);
- de conjuguer les hormones aux acides glucuronique et sulfurique et de lier ensuite les conjugués aux protéines du sang;
- de jouer un rôle important dans le cycle entéro-hépatique.

## DEUXIÈME PARTIE

# DOSAGE DES ŒSTROGÈNES DANS LE SANG ET LES TISSUS HUMAINS

## CHAPITRE PREMIER

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### I. — MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DES ŒSTROGÈNES SANGUINS

##### *Intérêt de la mesure des œstrogènes sanguins*

Depuis 1955, sous l'impulsion de M. le Professeur Varangot, nous avons consacré la majeure partie de notre activité à la mise au point d'une technique de mesure suffisamment précise et spécifique et à son application au métabolisme des œstrogènes dans l'espèce humaine.

Le taux des œstrogènes dans le sang circulant représente un équilibre entre la sécrétion des hormones par les glandes endocrines d'une part, et d'autre part, leur utilisation par les organes récepteurs et leur élimination par les voies excrétrices.

*Le dosage des œstrogènes dans le sang circulant ou dans les vaisseaux efférents aux tissus sécrétoires (ovaire, surrénale) fournit donc une idée plus exacte de la physiologie des œstrogènes que l'exploration chimique des œstrogènes urinaires effectuée habituellement.*

Il permet également d'éviter les causes d'erreur dues à une mauvaise collecte des urines, et que le dosage de la créatininurie ne permet pas toujours d'éliminer.

Brown et collaborateurs (1959-1962) ont par ailleurs montré dans une série très importante de dosages des œstrogènes urinaires dans les cycles normaux et certains troubles gynécologiques qu'il existe des variations individuelles et journalières considérables rendant nécessaire l'exploration systématique des urines toutes les 48 heures et même plus précisément toutes les 24 heures pendant la période supposée de l'ovulation.

Nous avons pu, par contre, et nous y reviendrons, remarquer parfois dans le sang des éléments nettement anormaux qu'une seule prise d'essai permet d'affirmer : absence d'œstriol en phase lutéale dans des cas de stérilité endocrinienne, présence anormale d'œstriol après la ménopause ou en phase folliculaire en cas de métrorragies (cancer utérin, fibrome).

### *Difficultés et choix d'une technique de dosage*

Mais la mesure des œstrogènes sanguins présente de sérieuses difficultés qui en font plus une technique de recherche qu'une méthode d'usage clinique courant.

En effet, sauf dans la deuxième partie de la grossesse, le taux des œstrogènes dans le sang est extrêmement faible et trop bas pour être décelé avec certitude par les techniques chimiques ou biologiques courantes.

Il existe aussi des substances perturbatrices : quoique moins abondantes que dans les urines, elles donnent des résultats en excès aussi bien lors des réactions colorées que lors des mesures fluorimétriques.

Tout récemment, Miss Roy (1962 b) a constaté une fluorescence de base irréductible de 0,02 µg/100 ml de sang après utilisation d'une technique comprenant : saponification, méthylation, chromatographie sur alumine et fluorimétrie après réextraction selon la méthode d'Ittrich (1958).

Il est donc nécessaire de soumettre les techniques chimiques que l'on désire employer à une étude sévère des critères de précision, sensibilité, reproductibilité et surtout spécificité (Borth, 1952) dans leur application aux extraits sanguins.

Il serait évidemment très intéressant de séparer et d'étudier quantitativement chaque composé individuel libre ou conjugué. Mais il n'existe pas à l'heure actuelle de technique de dosage dans le sang des œstrogènes de découverte récente. La grande labilité de certains (16α-OH-œstrone détruits dans la soude), la faible solubilité de certains autres (6α-OH-œstradiol) dans l'éther, et enfin leurs pouvoirs chromogène ou fluorogène différents rend leur mesure quantitative dans le sang très aléatoire.

De même, le dosage et l'identification des divers œstrogènes conjugués est très délicate. Il ne peut s'agir que de l'analyse de quelques échantillons seulement, étant donné la grande quantité de sang nécessaire. Nous avons actuellement réuni et préparé — (précipitation par l'alcool à 95°

à pH 8, et évaporation sous azote) — plus de 22 litres de sang afin d'étudier avec le docteur Diczfalusy et ses collaborateurs les différents modes de conjugaison des œstrogènes dans le sang de femmes enceintes (Cedard et Diczfalusy, 1962).

Les techniques habituellement utilisées se limitent donc au dosage de l'œstrone, de l'œstradiol-17 $\beta$  et de l'œstriol totaux après hydrolyse.

La recherche de la simplicité pour les analyses multiples ne doit pas faire négliger la sensibilité ni surtout la spécificité.

Pour la mesure des œstrogènes au cours de la grossesse, plusieurs techniques sont possibles à l'heure actuelle, un certain nombre d'entre elles ayant d'ailleurs été publiées après notre mise au point personnelle.

### *Les méthodes biologiques*

Elles ont été employées jusqu'en 1955 (Albrieux, 1941 a et b; Krichevski et Glass, 1947). En dépit de leur grande sensibilité : la dose moyenne efficace dans le test d'Allen et Doisy est en effet après injection vaginale de 0,0003  $\mu$ g d'œstrone, ces techniques sont actuellement peu utilisées.

En effet, les résultats sont influencés par de faibles modifications expérimentales, telles que le solvant utilisé ou le mode d'injection. Il est d'autre part dangereux d'injecter sans purification préalable des extraits bruts contenant des « pro-œstrogènes » (comme les androgènes) qui peuvent se transformer en œstrogènes chez l'animal injecté.

Il est enfin nécessaire d'utiliser un grand nombre d'animaux (20 à 40 pour chaque test), ce qui augmente considérablement la quantité d'hormone nécessaire et ramène la sensibilité à celle des méthodes chimiques.

Les dosages biologiques ne sont plus guère utilisés actuellement que pour assurer la validité des méthodes chimiques.

### *Les méthodes chimiques*

Ce sont donc les plus couramment employées.

*1° Collection et stockage des échantillons.* — Les échantillons de sang doivent être refroidis immédiatement après le prélèvement. Diczfalusy et Magnusson (1958) ont constaté qu'il était possible de les conserver à  $-15^{\circ}$  pendant longtemps. Roy et Brown (1960) ont également montré que les œstrogènes endogènes étaient stables pendant plusieurs jours dans le sang total s'il était conservé à  $4^{\circ}$  C.

Certains auteurs (Preedy et collaborateurs, 1957-1961; Veldhuis, 1953; Slaunwhite et Sandberg, 1959, Oertel, 1961) utilisent le plasma séparé des globules rouges dès le prélèvement. C'est ce qu'ont également préconisé Schwerts (1964) d'une part, Smith et Arai (1963) d'autre part.

Mais les études entreprises *in vitro* et *in vivo* avec de l'œstradiol marqué au carbone 14 ont montré que des quantités allant jusqu'à 30 % ou plus de la totalité des œstrogènes sanguins peuvent s'associer aux globules rouges *in vitro* (Sandberg et Slaunwhite, 1957; Wall et Migeon, 1959; Migeon, Wall et Bertrand, 1959). Une certaine quantité d'œstrogènes peut donc échapper aux dosages effectués sur le plasma seulement.

Aussi comme Roy et Brown (1960) nous avons préféré utiliser le sang total prélevé sur anti-coagulants et conservé à 4° C s'il ne pouvait être hydrolysé immédiatement.

La présence de globules rouges n'introduit d'ailleurs aucune perturbation supplémentaire pendant le dosage.

### 2° *Libération des œstrogènes des liaisons protéiques et hydrolyse.*

— Il serait évidemment très intéressant d'utiliser une méthode séparant le plasma des globules rouges et isolant les œstrogènes libres, conjugués, et liés aux protéines. Ces méthodes qui nécessitent des quantités considérables de sang ne peuvent être d'utilisation courante. A l'heure actuelle, la plupart des auteurs (Roy et Brown, 1960; Preedy et Aitken, 1961 b; Oertel, 1961 b) préfèrent comme nous-mêmes la dénaturation des protéines et l'hydrolyse par l'acide chlorhydrique à ébullition après dilution du sang dans de l'eau distillée.

L'hydrolyse enzymatique spécifique, plus séduisante, ne peut s'effectuer que sur des extraits déprotéinisés, ce qui complique évidemment le problème, car il est certain que tous les œstrogènes liés aux protéines ne sont pas quantitativement extraits par l'alcool éthylique habituellement utilisé pour la déprotéinisation (Smith et Arai, 1963).

3° *Purification des extraits.* — Les procédés utilisés pour la préparation des œstrogènes sanguins sont dérivés des méthodes employées pour la purification des œstrogènes urinaires.

Nous n'insisterons donc pas sur ces techniques qui comportent en général une extraction par l'éther et la séparation des phénolstéroïdes par partage entre une solution aqueuse de NaOH et un solvant organique. Certaines méthodes comme celle de Roy et Brown comportent un partage entre un mélange benzène-éther de pétrole d'une part, et d'autre part de l'eau contenant 0,5 % d'alcool éthylique qui sépare l'œstriol, phénolique fort, de l'œstrone et de l'œstradiol moins hydrosolubles.

Nous avons également utilisé ce procédé déjà préconisé par Finkelstein (1951) pour le dosage des œstrogènes urinaires.

La présence de substances parasites et la nécessité de séparer les trois œstrogènes rend nécessaire à ce stade la purification des extraits par distribution à contre-courant (Oertel, West, Eik-Nes, 1959; Diczfalusy et Magnusson, 1958), ou plus fréquemment par chromatographie.

a) **La chromatographie sur papier** est d'un emploi aisé et rapide et ne demande qu'un appareillage peu onéreux. Malheureusement elle n'est que semi-quantitative, l'élution des stéroïdes présentant souvent des difficultés à cause des propriétés adsorbantes du papier utilisé.

Nous ne parlerons pas ici des divers systèmes de solvants utilisables : ils sont très bien exposés dans de nombreux ouvrages (Lederer et collaborateurs, 1959; O'Donnel et Preedy in « Hormones in blood », 1961; Jayle et collaborateurs, 1962).

La chromatographie sur papier nécessite l'emploi d'extraits biologiques très bien dégraissés, et la résolution n'est pas aussi complète que dans les chromatographies sur colonne ou la distribution à contre-courant.

Cette méthode nous semble surtout intéressante dans les expériences d'identification après purification préalable par chromatographie préparatrice sur colonne ou en couche mince.

b) **La chromatographie sur colonne par adsorption** est la technique la plus couramment utilisée pour la séparation des trois œstrogènes classiques.

C'est une chromatographie sur colonne d'alumine que Roy et Brown emploient depuis plusieurs années avec succès ainsi que Diczfalusy et ses collaborateurs.

La standardisation de l'alumine est cependant assez délicate et le degré d'hydratation doit être fréquemment vérifié.

La séparation des substances est en outre moins efficace que dans les chromatographies de partage.

c) **La chromatographie sur colonne de partage** des œstrogènes a été étudiée de façon très précise par Preedy et Aitken (1961 b) dans les extraits urinaires et plasmatiques, et par Bauld dans les extraits urinaires.

Les avantages de cette technique sont considérables. En effet les résultats des chromatographies de partage sont mathématiquement prévisibles d'après certains facteurs : coefficients de partage, dimensions et volume de la colonne, nombre de fractions (Bauld et Greenway, 1957), les substances pures se distribuant selon une courbe de Gauss.

Des quantités assez considérables d'extraits biologiques peuvent être chromatographiées sur les colonnes de célite habituellement utilisées et des systèmes de grand pouvoir résolutif ont été sélectionnés permettant une séparation efficace et reproductible des œstrogènes.

Les colonnes sont assez délicates à préparer, surtout si elles sont de grande hauteur.

Cependant dans le cas des œstrogènes sanguins, étant donné la faible concentration en œstrogènes, des colonnes de petite dimension (5 cm de haut) sont suffisantes et d'un remplissage aisé pour une personne entraînée.

La méthode de Preedy et Aitken (1961 b) est fort longue puisque la chromatographie à elle seule demande 36 heures et que 75 à 80 mesures de fluorescence doivent être faites pour chaque échantillon.

C'est la raison pour laquelle nous avons préféré mettre au point une technique plus rapide adaptée de celle de Bauld (1956).

4° **Détection des œstrogènes.** — Le manque de précision de certaines techniques : mesure de l'absorption à 280 m $\mu$ , polarographie pour l'œstrone, réaction de David pour l'œstriol, les élimine d'emblée.

**La chromatographie en phase gazeuse**, par contre, semble une méthode d'avenir étant donné son extrême sensibilité, mais elle n'a pas encore dépassé le stade expérimental (Wotiz et Martin, 1961; Horning et collaborateurs, 1962).

a) **La colorimétrie** a été employée essentiellement par Miss Roy (1958, 1960, 1962) sous forme d'une microméthode de la réaction de Brown (1955) avec application de la correction d'Allen (1950). En dépit de l'utilisation de microcuvettes introduites dans un dispositif spécial, la sensibilité de la technique reste assez faible et insuffisante pour mesurer avec précision les œstrogènes sanguins en dehors de la grossesse ou avant la douzième semaine de celle-ci. C'est d'ailleurs la raison pour laquelle tout récemment Miss Roy (1962 b) vient d'essayer l'application aux extraits sanguins de la méthode fluorimétrique d'Ittrich (1958).

b) **La fluorimétrie**, en effet, présente une beaucoup plus grande sensibilité. Elle est basée sur la propriété qu'ont les œstrogènes de produire une fluorescence intense par chauffage avec les acides phosphorique et sulfurique. Finkelstein (1952) a préconisé le développement de la fluorescence en présence d'acide phosphorique comme la méthode la plus spécifique.

Nous avons essayé cette technique, assez peu employée d'ailleurs, et l'avons rapidement abandonnée, car elle est très délicate, sensible à la lumière et perturbée par la moindre trace d'humidité. La fluorescence dans l'acide sulfurique, soit concentré, soit faiblement dilué par l'eau ou par l'éthanol, est utilisée par la plupart des auteurs.

Nous n'insisterons pas sur les modalités de développement de cette fluorescence, ni sur l'intensité relative des divers œstrogènes en fonction des techniques et des appareils utilisés. D'excellentes revues ont été publiées récemment à ce sujet (Bauld et collaborateurs, 1960; Preedy et Aitken, 1961 a; Jayle et collaborateurs, 1962).

Nous signalerons que l'exceptionnelle sensibilité de cette technique (de l'ordre de 0,100 à 0,01  $\mu$ g selon les modalités et l'appareil de mesure utilisés) la rend particulièrement apte au dosage des œstrogènes dans le sang ou les autres milieux biologiques pauvres en œstrogènes.

Le défaut de spécificité de la fluorescence en milieu sulfurique est de peu d'importance si on purifie suffisamment les extraits au préalable (chromatographie de partage par exemple) et si l'on prend soin de vérifier que les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont identiques pour chaque fraction et l'hormone pure correspondante.

La spécificité et la sensibilité de la mesure fluorimétrique sont augmentées par le procédé d'Ittrich (1958) qui élimine par réextraction de la fluorescence dans un solvant organique (tétrabromure ou tétrachlorure d'acétylène) la majeure partie des substances parasites.

En effet, dans les autres cas la sensibilité est limitée par une certaine fluorescence de base due aux réactifs utilisés au cours de la préparation des extraits et dont on doit tenir compte dans les calculs.

### *Méthode employée*

Après avoir utilisé de 1955 à 1957 une technique de dosage fluorimétrique des œstrogènes sanguins non chromatographiés (Varangot et collaborateurs, 1955), nous avons pris conscience de l'imperfection de cette méthode et porté nos efforts vers son amélioration.

Nous avons ainsi introduit une saponification dans la soude normale de la fraction œstrone-œstradiol souvent riche en lipides, saponification identique à celle que préconisent Brown et collaborateurs dans les urines post-ménopausiques (1957 b).

Nous avons également employé une chromatographie de partage sur colonne de célite voisine de celle de Bauld (1956).

a) *Appareils utilisés.* — 1° Batteries de calottes chauffantes pouvant recevoir les ballons d'hydrolyse ou de saponification et leurs réfrigérants.

2° Agitateur automatique (Agitelec Ets Escor) permettant l'extraction ou le lavage et la décantation dans six ampoules à décanter simultanément (fig. 8).

3° Bain-marie à circulation d'eau chaude permettant l'évaporation à sec des solvants organiques.

4° Appareil destiné à l'évaporation des solvants dans les tubes dits de « Kober » ou les ballons rodés. Les tubes (ou les ballons) sont évaporés par groupe de six; un système en verrerie (selon Diczfalusy) permet d'introduire de l'azote tout en maintenant une dépression créée par une pompe à vide (fig. 9).

5° Spectrofluorimétrie Farrand 104.242, comprenant deux monochromateurs à réseau et une lampe au xenon de 150 watts émettant un spectre continu. Il est muni d'un tube photomultiplicateur IP 28 et d'un filtre secondaire Corning 3-72 (3387) ne laissant passer que les rayons de longueur d'onde supérieure à 430 mμ.

Le microampèremètre initial D.C. a été remplacé par un microampèremètre Electro-synthèse.

L'appareil est étalonné par un cube en verre d'urane (Electro-synthèse)

dont les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont respectivement 412 et 530 m $\mu$ .

Les lectures sont faites dans des cuves de quartz fondu de 10  $\times$  10  $\times$  48 mm.



FIG. 8. — *Agitateur automatique Agitelec* (Etabl. ESCOR).

6° *Verrerie*. — *a)* Ampoules à décanter en verre Pyrex de 500 et 125 ml, de forme « poire ».

*b)* Ballons à hydrolyse 250 ml à rodage normalisé Rin 4 avec leurs réfrigérants.

*c)* Ballons pour la saponification (avec réfrigérants correspondants) et pour l'évaporation, à rodage normalisé, respectivement Rin 3 et Rin 2.

d) Tubes dits de Kober de 16 mm, 160 mm, épaisseur 1 mm, à rodage normalisé Rin 2, avec bouchons de verre.

e) Colonnes à chromatographie en verre Pyrex de 11 mm de diamètre



FIG. 9. — Schéma de l'appareil pour l'évaporation des solvants (d'après DICZFALUSY).

intérieur, hauteur 14 cm. La partie supérieure, légèrement évasée, est munie d'un rodage femelle Rin 2. On peut ainsi, soit placer successivement les diverses solutions éluantes, à la pipette, soit adapter un réservoir muni d'un robinet et d'un rodage mâle Rin 2, afin d'assurer un remplissage

régulier de la colonne si l'on dispose d'un collecteur automatique de fraction. La colonne est terminée en bas par un tube semi-capillaire de 2 cm de haut.

*f) Nettoyage de la verrerie.*

La verrerie est lavée soigneusement après usage, à l'eau courante et à l'eau distillée. En cas d'impuretés visibles, elle est mise à tremper pendant 12 à 24 heures dans du mélange sulfo-chromique. Elle est ensuite rincée à l'eau courante et à l'eau distillée, puis à l'alcool pour détruire les restes d'acide chromique. Elle est enfin séchée à l'étuve. Il est préférable de ne pas utiliser de produits détergents. *Il est recommandé d'employer pour le dosage des œstrogènes une verrerie spécialement réservée à cet usage.* Ne jamais utiliser de lubrifiants ni de bouchons de caoutchouc. Graphiter simplement au crayon noir les rodages qui risquent de gripper. Éviter au maximum l'emploi de bouchons de liège et les remplacer dans la mesure du possible par des bouchons ou des coudes à évaporer en verre rodé.

*b) Purification des réactifs.* — 1° Ether éthylique sans peroxyde fraîchement redistillé sur chlorure stanneux.

2° Benzène pur cristallisable sans thiophène, lavé avec  $\text{SO}_4\text{H}_2$  concentré puis  $\text{H}_2\text{O}$  jusqu'à neutralité, redistillé juste avant l'emploi.

3° Éther de pétrole, redistillé entre 45 et 55°.

4° Alcool méthylique R.P. fraîchement redistillé.

5° (1-2)-dichlorure d'éthylène (Laboratoires du Bois de Boulogne) filtré sur colonne de gel de silice (Merck) : diamètre 25 mm, hauteur 20 cm, 1/2 litre de réactif. Mettre un tampon de fibre de verre à la base et au sommet de la colonne. Bien tasser celle-ci. Laisser filtrer pendant la nuit. Redistiller dans les 24 heures qui précèdent l'emploi.

6° Célite 535 (Laboratoires du Bois de Boulogne), lavée deux fois avec HCl concentré puis  $\text{H}_2\text{O}$  jusqu'à neutralité. Rincer à l'alcool éthylique à 95°, puis sécher au four à 110° pendant 48 heures. Garder dans des récipients très hermétiques, bouchés émeri, en l'absence d'humidité, ou mieux dans un dessiccateur.

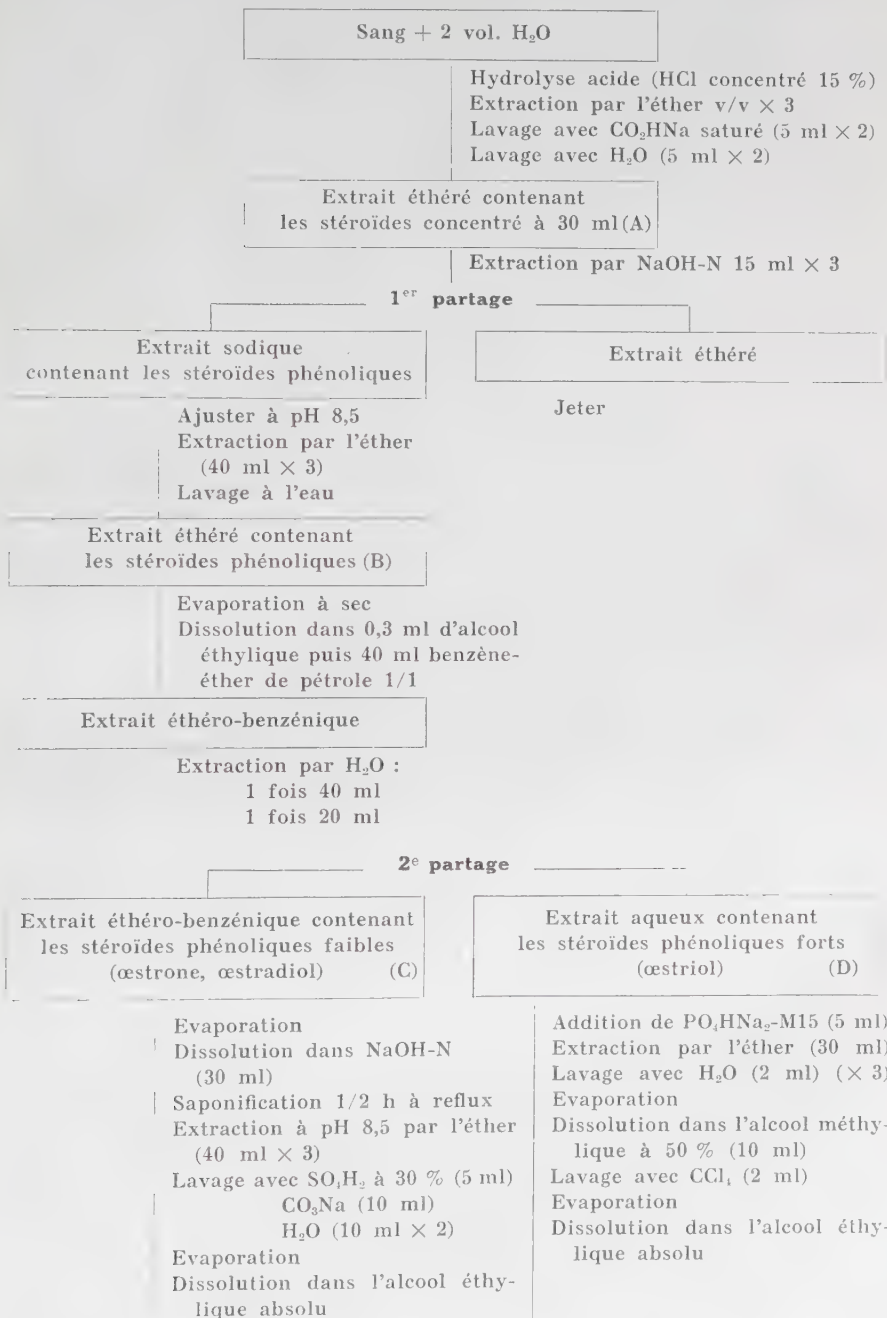
7° Fibre de verre, lavée à l'alcool éthylique à 95°, séchée à l'étuve à 100°.

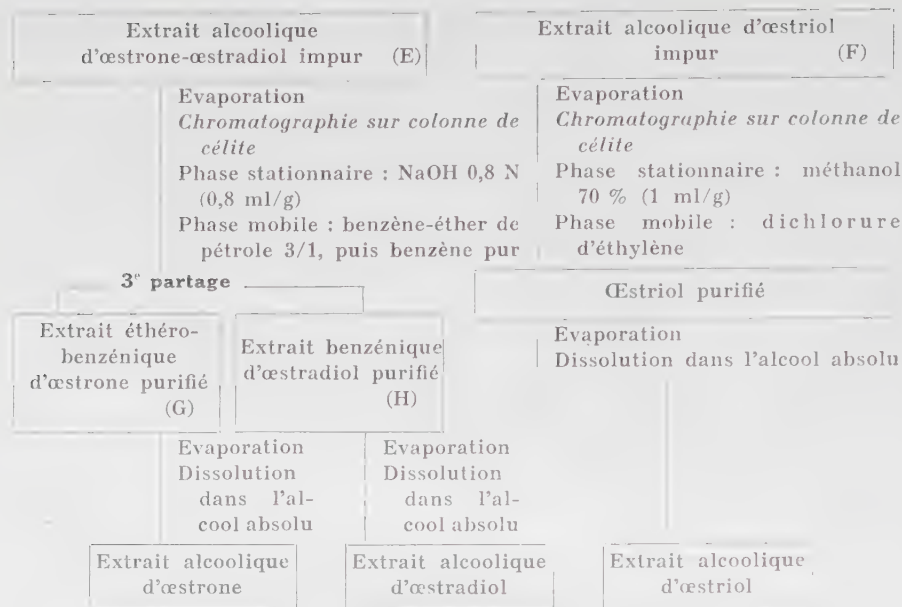
8° Acide sulfurique Merck dilué avec  $\text{H}_2\text{O}$  distillé à 88° v/v (densité 1,80).

*c) Prélèvement du sang.* — On recueille le sang total sur des cristaux de citrate de sodium. Le dosage est effectué sur 15 à 20 ml de sang (on demande donc en général 40 ml afin de pouvoir effectuer le dosage en double). Bien agiter avec une baguette de verre pour éviter la coagulation.

*d) Méthode d'extraction et de purification du sang.* — Le procédé de purification et d'extraction est résumé dans le schéma ci-après (tableau V).

TABLEAU V. — RÉSUMÉ SCHÉMATIQUE DE LA TECHNIQUE DE DOSAGE DES ŒSTROGÈNES SANGUINS.





**1° Hydrolyse.** — Le sang est hémolysé avec 2 volumes d'H<sub>2</sub>O distillée. Il est ensuite hydrolysé à reflux pendant 20 minutes après addition de 15 % v/v d'HCl concentré.

L'hémolyse et d'hydrolyse doivent être effectuées dans les heures qui suivent le prélèvement. A défaut, le sang peut être conservé dans un frigidaire à 4° pendant quelques jours.

**2° Extraction des stéroïdes.** — Après refroidissement, on ajoute à l'hydrolysât 10 grammes de ClNa. On extrait ensuite trois fois avec 50 ml d'éther éthylique fraîchement redistillé. Il est habituellement nécessaire de centrifuger 7 minutes à 2.000 tours/minute après chaque extraction. On lave les extraits étherés mélangés, deux fois avec 5 ml d'une solution de bicarbonate de sodium saturée, puis deux fois avec 5 ml d'eau distillée.

**3° Séparation de la fraction phénolique.** — L'extrait étheré lavé est concentré jusqu'à 30 ml environ par évaporation sous vide. On extrait ensuite trois fois avec 15 ml de soude normale.

Cet extrait sodique contenant les stéroïdes phénoliques est ajusté à pH 8,5 avec HCl. On extrait ensuite, avec de l'éther (40 ml) à trois reprises. L'extrait étheré est lavé une fois avec 5 ml d'H<sub>2</sub>O.

**4° Séparation en deux fractions œstrogéniques par partage entre solvant organique et eau.** — L'extrait étheré (B) est évaporé à sec sous pression réduite. Il est ensuite dissous dans 0,3 ml d'alcool absolu. On ajoute 40 ml d'un mélange à parties égales de benzène Merck et d'éther de pétrole

préparé extemporanément. Cette solution est extraite une fois avec un volume égal d'eau et une fois avec un demi-volume d'eau distillée.

**5° Purification préliminaire de la fraction éthéro-benzénique contenant l'œstrone et l'œstradiol (C).** — La solution éthéro-benzénique C contenant l'œstrone et l'œstradiol est évaporée à sec sous vide. Elle est portée à l'ébullition à reflux pendant 30 minutes dans 30 ml de NaOH normale. La solution sodique est ensuite amenée à pH 8-8,5 avec HCl, puis extraite à trois reprises avec 40 ml d'éther éthylique. On lave ensuite successivement avec :

- 5 ml de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  à 30 %,
- 10 ml de  $\text{CO}_3\text{NaH}$  saturé,
- 10 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ , habituellement deux fois pour amener à la neutralité.

On dessèche sur du sulfate de sodium anhydre, on évapore à sec sous pression réduite, on reprend par 2 cm<sup>3</sup> d'alcool absolu.

**6° Purification préliminaire de la fraction aqueuse contenant l'œstriol (D).** — A l'extrait aqueux contenant l'œstriol, on ajoute 5 ml de phosphate disodique ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) M/15. On extrait trois fois avec un demi-volume d'éther éthylique. On lave avec 2 ml d' $\text{H}_2\text{O}$ . On évapore à sec sous pression réduite.

Le résidu sec est repris par 10 ml de méthanol à 50 % et lavé avec 2 ml de tétrachlorure de carbone.

La solution méthanolique est évaporée à sec et reprise par 2 ml d'alcool éthylique absolu.

**7° Chromatographie de la fraction œstrone-œstradiol.** — *a) REMPLISSAGE DE LA COLONNE.* — Peser environ 1,5 gramme de célite par colonne. Tasser dans le fond de la colonne de la fibre de verre sur une hauteur de 1/2 cm. Imprégner soigneusement la célite avec de la soude 0,8 fois normale, 0,8 ml par gramme que l'on ajoute en plusieurs fois. Préparer la phase mobile initiale (benzène-éther de pétrole 3/1) et en verser un peu sur la célite afin d'obtenir une bouillie. Verser ensuite cette bouillie dans la colonne de verre sur une hauteur de 5 cm en tassant bien avec un agitateur et en évitant toute irrégularité de remplissage. Recouvrir d'un tampon de fibre de verre.

*b) LA CHROMATOGRAPHIE SE FAIT à la température du laboratoire, il faut rester cependant aux environs de 18 à 20 degrés. La vitesse d'écoulement du solvant est de 10 à 12 ml par heure. Il n'est pas nécessaire de faire le vide.*

Rincer la colonne avec 5 ml du mélange benzène-éther de pétrole 3/1. Reprendre l'extrait œstrone-œstradiol (E) que l'on a, au préalable, évaporé à sec, par 0,5 ml du mélange benzène-éther de pétrole. Verser soigneusement avec une pipette effilée au sommet de la colonne en évitant de toucher les parois de verre. Répéter trois fois cette opération en versant les extraits quand le sommet de la colonne est juste sec. Verser ensuite 5 ml de phase

mobile. Puis, après avoir bien essuyé les dernières gouttes avec du papier filtre, verser 10 ml du mélange benzène-éther de pétrole 3/1 que l'on recueille dans un tube rodé bouché émeri. Cette fraction contient l'œstrone. On évapore à sec sous pression réduite et si possible courant d'azote et on reprend par 0,2 ml d'alcool éthylique.

Verser de nouveau 10 ml du mélange benzène-éther de pétrole. Jeter cet éluat. Verser ensuite 20 ml de benzène pur que l'on recueille dans un

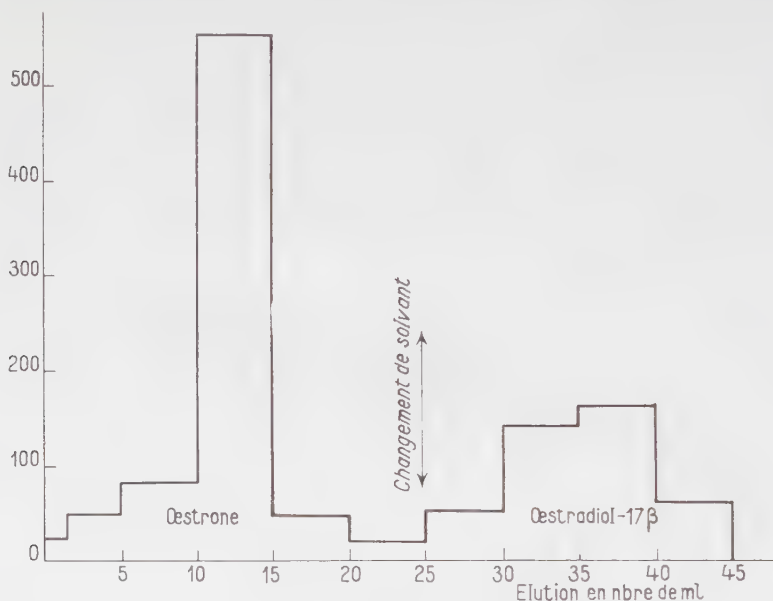


FIG. 10. — *Elution fractionnée de l'œstrone et de l'œstradiol 17 $\beta$  par chromatographie de partage sur colonne de célite (phase stationnaire NaOH 0,8 N, phase mobile benzène/éther de pétrole 3/1 puis benzène pur).*

ballon rodé. Cette fraction contient l'œstradiol-17 $\beta$ . On concentre, puis on transvase dans des tubes rodés, on évapore, on reprend par 0,2 ml d'alcool éthylique absolu (H).

**8° Chromatographie de l'œstriol impur (F).** — On pèse également 1,5 gramme de célite par colonne. On prépare celle-ci comme précédemment avec de la fibre de verre à la base. On imprègne la célite avec de l'alcool méthylique à 70 %, 1 ml par gramme. On verse du dichlorure d'éthylène fraîchement redistillé jusqu'à obtention d'une bouillie épaisse que l'on tasse dans la colonne sur une hauteur de 5 cm. On recouvre d'un tampon de fibre de verre. On lave la colonne avec 3 ml de dichlorure d'éthylène. On reprend l'extrait d'œstriol (F) que l'on a au préalable évaporé à sec, par 0,5 ml de dichlorure d'éthylène. On place cet extrait soigneusement au sommet de la colonne à l'aide d'une pipette effilée. On répète trois fois cette opéra-

tion. Quand le sommet de la colonne est sec, on verse 3 ml de dichlorure d'éthylène. Cet éluat est jeté. On verse ensuite 8 ml de dichlorure d'éthylène. On recueille cet éluat qui contient l'œstriol dans un tube à essai rodé bouché émeri. On évapore à sec sous pression réduite et on reprend par 0,2 ml d'alcool éthylique (extrait I).

Il est nécessaire d'employer du dichlorure d'éthylène fraîchement redistillé, car le dichlorure d'éthylène vieilli peut donner une coloration brune avec l'acide sulfurique.

**Développement et mesure de la fluorescence.** — Aux 0,2 ml d'extraits alcooliques (G, H, I), on ajoute dans les tubes bouchés émeri 4 ml d'acide sulfurique Merck à 88 % v/v (densité 1,80) (Diczfalusy, 1953).

On chauffe au bain-marie bouillant à l'obscurité pendant 10 minutes; on refroidit 10 minutes dans l'eau glacée à l'obscurité. On lit au spectrofluorimètre Farrand, étalonné au préalable avec un cube en verre d'urane selon les conseils de M. le Professeur Benard. Les mesures sont faites aux longueurs d'onde spécifiques de chaque hormone, sélectionnées avec précision grâce aux deux monochromateurs à réseau :

— œstrone : longueur d'onde maxima - excitation 447 m $\mu$  - émission 483 m $\mu$ ;

— œstradiol : longueur d'onde maxima - excitation 450 m $\mu$  - émission 487 m $\mu$ ;

— œstriol : longueur d'onde maxima - excitation 446 m $\mu$  - émission 480 m $\mu$ .

Pour chaque hormone, les courbes d'étalonnage sont faites de 0,05 à 1  $\mu$ g. Nous déduisons des valeurs obtenues la fluorescence d'un témoin intégral où l'eau distillée a subi depuis le premier partage (éther-soude) exactement les mêmes manipulations que le sang.

Il est nécessaire de vérifier fréquemment la place exacte des trois œstrogènes dans les chromatogrammes en utilisant des hormones pures. La moindre altération d'un réactif, l'arrivage d'un nouveau lot de produit, un léger changement de température peuvent modifier la répartition des éluats.

Il est commode dans la pratique courante de faire les dosages en série : 8 à 11 dosages accompagnés chaque fois d'un témoin intégral. On peut s'aider pour les diverses manipulations d'agitateurs automatiques. Ne pas dépasser un délai de 15 jours entre le prélèvement et la fin du dosage. Ne jamais laisser d'extrait à l'état sec, sauf dans des tubes à essai bien bouchés pour éviter l'oxydation.

### *Vérifications techniques*

Il est important de savoir si les résultats analytiques sont proches des résultats vrais (exactitude), de connaître la reproductibilité des résultats

(précision), la plus petite quantité analysable distincte de zéro (sensibilité) et de savoir si la méthode d'analyse mesure ce qu'elle doit mesurer et non autre chose (spécificité) (Borth, 1952).

Nous nous sommes proposé de soumettre notre technique de dosage des œstrogènes sanguins à ces épreuves.

#### a) PRÉCISION

La mesure de la précision d'une technique est obtenue soit en faisant de nombreuses mesures répétées sur un même échantillon, et en calculant la déviation standard entre ces résultats et leur moyenne, soit, et c'est ce que nous avons effectué, par la méthode de Snedecor (1952), dans laquelle on estime :

$$s = \sqrt{\frac{\sum d^2}{2N}}$$

d'après la différence entre les deux résultats des mesures effectuées en double dans une série de dosages avec :

$d$  = la différence entre les deux résultats dans la mesure en double;  
et  $N$  = le nombre de dosages en double effectués.

L'avantage de cette méthode de calcul est de donner des informations concernant la précision d'une méthode dans les conditions d'application de routine.

Les dosages ayant été effectués par plusieurs personnes, toute notion de facteur personnel peut être écartée.

Dans ces conditions, nous avons trouvé que, pour :

|           |              |                                        |
|-----------|--------------|----------------------------------------|
| œstrone   | = 51 dosages | $s = 0,365 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ |
| œstradiol | = 52 dosages | $s = 0,342 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ |
| œstriol   | = 56 dosages | $s = 0,175 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ |

#### b) SENSIBILITÉ DE LA MÉTHODE

La sensibilité qualitative de la méthode est la plus faible quantité de substance mesurée qui est distinct de zéro ( $P = 0,01$ ). La sensibilité ainsi définie peut être calculée par :

$$\frac{t_s}{\sqrt{N}}$$

(Brown, Bulbrook et Greenwood, 1957 a).

On trouve ainsi pour :

|             |                                       |
|-------------|---------------------------------------|
| l'œstrone   | $s = 0,14 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ |
| l'œstradiol | $s = 0,13 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ |
| l'œstriol   | $s = 0,06 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ |

Cette précision est du même ordre de grandeur que par la méthode de Roy et Brown (voir à ce sujet la récente revue méthodologique de Schwerts, 1964).

A ces taux, le pourcentage maximum d'erreur pour les dosages en double est évidemment 100 %. Nous avons également effectué des récupérations à des taux faibles et nous avons constaté que des quantités aussi faibles que 0,1 ou 0,2  $\mu\text{g}$  d'hormone pure sont très bien récupérées après chromatographie. Nous signalerons également ici que la courbe de mesure de fluorescence commence à 0,05  $\mu\text{g}$  et qu'à partir de cette valeur les lectures sont très nettes et reproductibles.

### c) EXACTITUDE

L'exactitude ou écart entre la valeur analytique et la valeur vraie est également un paramètre intéressant.

En dehors de l'usage de substances marquées avec des isotopes, le seul moyen pratique de mesurer cette exactitude est l'utilisation d'un standard interne, c'est-à-dire la récupération d'hormone pure.

1° Nous avons hydrolysé par l'acide chlorhydrique à chaud des sulfates d'œstrone et d'œstradiol et les glucosiduronates d'œstradiol et d'œstriol, et après extraction par l'éther nous avons pu constater :

— que la totalité des œstrogènes conjugués étaient hydrolysés comme en témoignaient les chromatographies sur couche mince de gel de silice dans le système A de Lisboa et Diczfalusy (1962) après révélation par le réactif anisaldéhyde, acide acétique, acide sulfurique (Lisboa et Diczfalusy, 1963);

— qu'une grande partie des œstrogènes conjugués était retrouvée sous forme libre par le réactif de Folin-Ciocalteau sur les chromatographies en couche mince, ou par le dosage fluorimétrique après chromatographie sur colonne de célite.

2° La récupération des hormones pures ajoutées aux extraits sanguins avant la chromatographie de partage s'est révélée satisfaisante, comme le montre le tableau suivant :

| Œstrone                           |              | Œstradiol                         |              | Œstriol                           |               |
|-----------------------------------|--------------|-----------------------------------|--------------|-----------------------------------|---------------|
| Quantité                          | %            | Quantité                          | %            | Quantité                          | %             |
| De 10 à 4 $\mu\text{g}$<br>(8)    | 93 $\pm$ 10  | De 10 à 3,5 $\mu\text{g}$<br>(4)  | 98 $\pm$ 16  | De 5 à 3,6 $\mu\text{g}$<br>(3)   | 98 $\pm$ 3,6  |
| De 2 à 1 $\mu\text{g}$<br>(10)    | 88 $\pm$ 4,7 | De 2 à 1 $\mu\text{g}$<br>(7)     | 92 $\pm$ 9,9 | De 2 à 1 $\mu\text{g}$<br>(12)    | 91 $\pm$ 11,8 |
| De 0,2 à 0,1 $\mu\text{g}$<br>(4) | 97 $\pm$ 5,2 | De 0,2 à 0,1 $\mu\text{g}$<br>(5) | 94 $\pm$ 1,7 | De 0,5 à 0,1 $\mu\text{g}$<br>(9) | 97 $\pm$ 5,0  |

Les valeurs entre parenthèses indiquent le nombre d'expériences effectuées.

3° Nous avons vérifié que la saponification de la fraction œstrone-œstradiol ne produisait pas de destruction des œstrogènes. En effet, les récupérations d'hormone pure sont inchangées, que l'on saponifie ou non 1/2 heure, l'extrait (C) éthéro-benzénique évaporé à sec et repris par la soude normale. Nous avons également constaté par de nombreux dosages en double (25 dosages) que la mesure fluorimétrique de l'œstradiol, moins perturbée par les lipides que celle de l'œstrone, était identique dans les extraits sanguins partagés en deux parties égales et dont une partie était saponifiée, l'autre non. La différence était plus ou moins grande pour l'œstrone, selon que les extraits étaient plus riches en lipides, ce dernier cas se traduisant souvent par une grande lenteur dans la chromatographie, que la saponification permet d'accélérer.

Tout récemment, Miss Roy a également introduit un temps de saponification identique dans sa méthode de dosage.

4° Nous avons également effectué de nombreuses récupérations d'hormone pure ajoutée aux extraits sanguins hydrolysés lors de l'extraction par l'éther.

| œstrone                 |           | œstradiol              |           | œstriol                 |           |
|-------------------------|-----------|------------------------|-----------|-------------------------|-----------|
| Quantité                | %         | Quantité               | %         | Quantité                | %         |
| De 20 à 5 µg ..<br>(13) | 53 ± 16,5 | De 20 à 5 µg ..<br>(4) | 50 ± 15,7 | De 10 à 5 µg ..<br>(12) | 51 ± 16,5 |
| De 4 à 1 µg ..<br>(11)  | 62 ± 26   | De 4 à 1 µg ..<br>(18) | 54 ± 25,4 | De 4 à 1 µg ..<br>(8)   | 52 ± 20,6 |

*Les valeurs entre parenthèses indiquent le nombre de dosages effectués.*

Les récupérations ainsi obtenues sont assez faibles surtout si on les compare à celles qui ont été obtenues dans les urines par la méthode de Brown (Brown, 1955; Diczfalusy et Westman, 1956, Brown, Bulbrook et Greenwood, 1957).

Cependant cette technique appliquée au sang par Miss Roy donne des récupérations beaucoup moins bonnes et beaucoup plus dispersées que dans les urines (œstrone 67 %; œstradiol 69 %) (Roy et Brown, 1960).

De même, Diczfalusy constate des pertes importantes lors de l'extraction et de la purification des extraits placentaires (40 à 90 %), des matières fécales (1959) ou du sang du cordon (œstrone 65 %, œstradiol 69,1 %, œstriol 81,5 %, 1958) et emploie finalement des valeurs corrigées en fonction de ses expériences de récupération.

La plupart des auteurs pensent que ce défaut de récupération est dû à une adsorption partielle sur les protéines hydrolysées et à l'action perturbatrice des lipides par la formation d'émulsion ou la modification des coefficients de partage.

Bauld (1955) attribuait un rôle au  $\text{Fe}+++$  puisque des traces de fer ajoutées à l'eau du témoin ont pu causer des destructions massives d'œstrogènes.

Ceci expliquerait peut-être que Heugshem (1957) a obtenu de bonnes récupérations après addition d'œstrogènes au plasma, déprotéinisé par l'acétone ou dialysé en milieu alcalin. De même Preedy et Aitkeen (1961), après addition d'hormone au plasma avant l'hydrolyse, ont des récupérations allant de 58 à 85 % et inférieures seulement de 10 % à celles qu'ils obtiennent dans les urines.

Enfin Smith et Arai (1963), en appliquant la technique de Roy et Brown à du plasma oxalaté au lieu de sang frais, et en utilisant une extraction continue par le benzène, ont augmenté considérablement la récupération des hormones ajoutées (90 % environ) ainsi que la précision de la méthode.

#### d) SPÉCIFICITÉ

C'est vers la preuve de la spécificité de notre technique que nous avons porté tous nos efforts.

En effet, les procédés classiques de mesure du point de fusion ou la spectroscopie infrarouge ne peuvent être employés dans les extraits sanguins en raison des trop petites quantités en présence, de l'ordre du microgramme par 100 ml.

Aussi nous sommes-nous efforcés de grouper un faisceau de preuves physiques, chimiques et biologiques.

**1° Les substances mesurées sont éluées lors des chromatographies exactement au même moment que les œstrogènes purs** et nous avons vérifié que l'adjonction d'extraits sanguins ne modifiait pas l'ordre de passage de ces hormones.

**2° Nous avons pu constater, soit dans le sang, soit dans les urines, que les valeurs obtenues étaient très comparables, que l'on effectue sur les extraits chromatographiés la réaction colorimétrique de Brown (1955) et la correction d'Allen (1950) ou des mesures fluorimétriques.** La bonne correspondance des résultats obtenus par des moyens différents nous permet de conclure qu'il s'agit des mêmes substances et que les extraits sanguins après chromatographie contiennent des œstrogènes bien purifiés.

Nous avons également étudié les courbes d'absorption dans le visible de la réaction de Brown (fig. 11).

Pour l'œstrone, l'extrait de sang de femme enceinte présente comme l'hormone pure une courbe en clocher avec un maximum à 510 m $\mu$ , alors que l'extrait correspondant à du sang d'homme a une courbe régulièrement descendante.

Pour l'œstradiol, nous avons obtenu deux courbes identiques en clocher avec maximum à 512 m $\mu$  pour 0,54  $\mu\text{g}$  d'hormone pure et un extrait de

plasma de femme enceinte de 6 à 8 mois dont le dosage fluorimétrique correspondait à la même quantité d'hormone.

Pour l'œstriol, nous avons également obtenu deux courbes en clocher superposables avec maximum à 510 m $\mu$  pour 5  $\mu$ g d'hormone pure et du

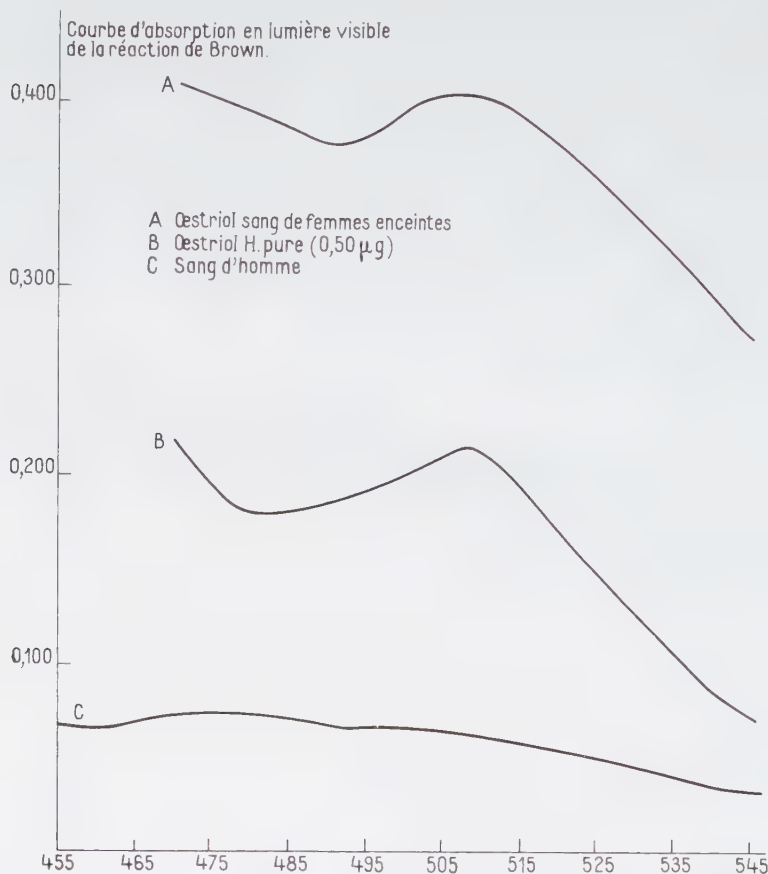


FIG. 11. — Courbe d'absorption en lumière visible de la réaction de Brown.

plasma de femme enceinte. Avec le sang d'homme par contre, nous avons obtenu une courbe strictement horizontale, donnant une valeur nulle après la correction d'Allen.

3° Nous avons également étudié **les courbes d'absorption dans l'ultra-violet** des extraits sanguins chromatographiés et laissés deux heures à l'obscurité dans l'acide sulfurique concentré selon la technique de Burnstein et Leenhardt (1958).

Pour l'œstrone, nous avons constaté trois maxima à 228, 300 et 352 m $\mu$

et deux minima à 253 et 332  $m\mu$ , identiques pour 0,3  $\mu g$  d'hormone pure par ml de  $SO_4H_2$  et un pool de sang de femmes enceintes. La densité optique est cependant plus forte à 300  $m\mu$  pour le sang que pour l'hormone pure.

Pour l'œstriol, il existe une excellente concordance qualitative et quantitative entre 0,5  $\mu g$  d'hormone par ml  $SO_4H_2$  et un pool de sang de femmes

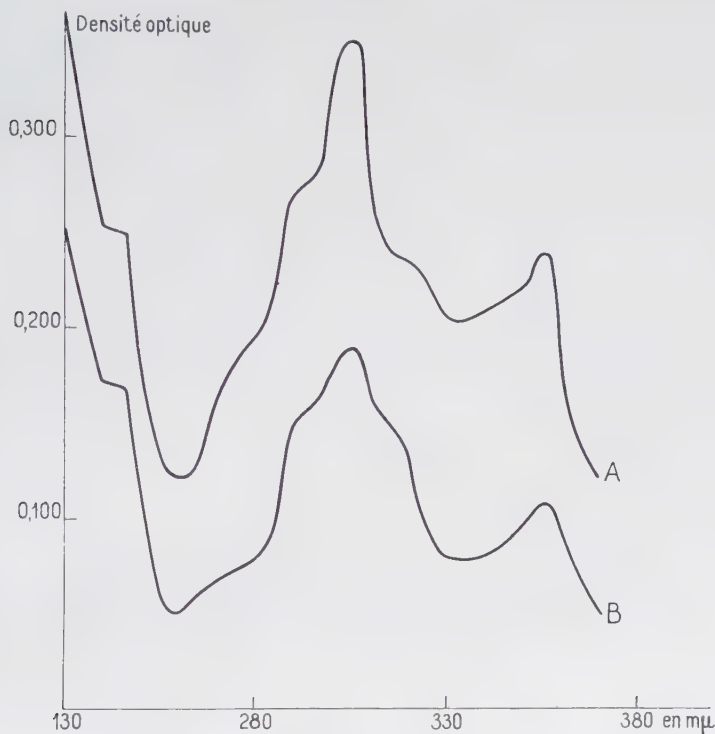


FIG. 12. — Spectre d'absorption en lumière ultraviolette.  
d'un extrait de sang de femmes enceintes (fraction œstriol).

A, extrait de sang de femme enceinte (80 ml) correspondant à 2  $\mu g$  d'hormone dans 4 ml  $SO_4H_2$ ; B, 2  $\mu g$  d'hormone pure dans 4 ml  $SO_4H_2$ .

enceintes, les deux courbes présentant trois maxima à 230, 305, 355  $m\mu$  et deux minima à 260 et 330  $m\mu$  (fig. 12).

Nous n'avons malheureusement pas pu recueillir suffisamment d'œstradiol dans le pool de sang préparé à cet effet et nous n'avons pu, par suite, avoir un spectre suffisamment net. Nous avons par contre pu l'obtenir à partir du liquide de kyste folliculaire dont la richesse en œstradiol-17 $\beta$  est beaucoup plus grande (fig. 13).

4° Nous avons plus récemment effectué sur des extraits de sang de femmes enceintes une **acétylation avec de l'anhydride acétique** et de la

pyridine (1/1) pendant 18 heures à 20° C (Bryson et collaborateurs, 1962). Nous avons pu constater après chromatographie sur couche mince de gel de silice dans le système A (acétate d'éthyle-cyclohexane-éthanol 45/45/10) de Lisboa et Diezfalusy (1962) et révélation par le réactif de Folin, l'existence de trois taches de R<sub>f</sub>s identiques à ceux de l'œstrone, de l'œstradiol-17β et de l'œstriol acétylés de façon identique.

5° On a souvent reproché aux méthodes fluorimétriques leur défaut de spécificité. En fait, l'obtention d'extrait suffisamment purifié peut pallier cette lacune.

Nous avons ainsi pu constater que :

Il n'y a pas de **self-absorption** (Braunsberg et Osborn, 1952), c'est-à-dire de diminution de la lumière incidente ou de la lumière émise par des substances non fluorogéniques présentes dans la solution.

En effet, nous avons, selon la technique d'Heugshem (1957), prélevé deux parties aliquotes de l'extrait, ajouté à l'une d'elles une quantité connue du stéroïde dosé, et comparé l'intensité des fluorescences développées par rapport à un essai témoin comportant à l'état pur la quantité de stéroïdes ajoutée à l'une des solutions. On obtient ainsi :

$$I = \text{Fluorescence hormone pure} - \frac{(\text{Fluorescence extrait} + \text{hormone}) - \text{Fluor. extr.}}{\text{Fluorescence hormone pure}}$$

Nous avons pu constater par de nombreuses séries de mesure effectuées sur les trois extraits chromatographiés, œstrone, œstradiol et œstriol, qu'il n'existait habituellement aucune inhibition de la fluorescence par les extraits sanguins. Il était toujours inférieur à + 10 % et souvent même légèrement négatif.

Nous avons utilisé jusqu'en 1961, pour les mesures, un spectrophotomètre Unicam S.P. 500 équipé d'une lampe à vapeur de mercure, d'un filtre secondaire sélectif pour les rayons de 520 mμ.

La comparaison systématique des mesures effectuées successivement avec cet appareil et avec le spectrofluorimètre Farrand pendant trois mois, soit 200 dosages environ, nous a montré que les résultats étaient presque identiques. Il en fut de même lors d'une série d'études comparatives effectuées avec le fluoroscimètre Electrosynthèse muni d'une lampe à vapeur de mercure et de filtres interférentiels.

L'emploi du spectrofluorimètre Farrand a cependant l'avantage de permettre la vérification des longueurs d'onde maxima d'émission et d'excitation, en particulier dans les dosages effectués chez les vertébrés inférieurs où l'on ne pouvait savoir *a priori* s'il s'agissait des hormones habituelles.

### *Dosage des œstrogènes urinaires*

*La technique que nous présentons ici pour le dosage des œstrogènes sanguins peut également s'appliquer aux extraits urinaires.*

Il est alors préférable de substituer à l'hydrolyse acide une hydrolyse enzymatique par la  $\beta$ -glucuronidase et la sulfatase du suc gastrique d'*Helix Pomatia* (Industrie biologique française).

50 ml d'urines sont hydrolysés pendant 24 heures à l'étuve à 37° après ajustage du pH à 4,5 et addition de 1.000 unités de  $\beta$ -glucuronidase et 500 unités de sulfatase par millilitres d'urines.

Nous avons en effet constaté comme la plupart des auteurs que les valeurs obtenues pour les trois œstrogènes urinaires étaient beaucoup plus élevées après hydrolyse enzymatique qu'après hydrolyse acide, et les pigments urinaires beaucoup moins abondants.

Nous avons jugé également préférable d'effectuer pour les urines la saponification sur l'extrait sodique initial avant le partage benzène-éther de pétrole/eau, afin de mieux purifier la fraction œstriol qui est beaucoup plus riche en chromogènes que dans les extraits sanguins.

## II. — DOSAGE DES ŒSTROGÈNES DANS LES TISSUS HUMAINS

*Nous avons pensé qu'il serait intéressant d'effectuer des dosages dans les divers tissus humains, en particulier dans ceux que l'on considère habituellement comme des tissus sécréteurs (ovaire) ou métabolisants (muqueuse utérine).*

Il est bien évident que la mesure des concentrations tissulaires, surtout dans les glandes à sécrétion interne telles que le corps jaune, ne peuvent donner une idée quantitative de la sécrétion, étant donné le drainage rapide par les vaisseaux efférents.

Cependant, les dosages comparatifs effectués par une technique identique dans différents tissus ont un certain intérêt. Ils permettent en particulier de comparer les pourcentages relatifs des divers œstrogènes et nous verrons en effet que les dosages que nous avons effectués ont confirmé la prédominance de l'œstradiol au niveau de l'ovaire et le rôle de la muqueuse utérine dans la biosynthèse de l'œstriol.

### *Technique*

Nous avons ajouté à notre méthode fluorimétrique de mesure des œstrogènes après chromatographie de partage les modalités d'extraction et de purification préalable de Diczfalusy (Diczfalusy et Lindkvist, 1956; Diczfalusy et Magnusson, 1958), légèrement modifiées. Le procédé d'extraction et de purification est résumé dans le tableau V bis.

**1° Broyage et extraction.** — La méthode utilisée comporte :

— soit un broyage au pilon de porcelaine dans un mortier en présence de quartz (Merck lavé, calciné), pour les tissus friables comme les corps jaunes et la muqueuse utérine;

— soit, pour les autres tissus, un laminage au couteau suivi d'un broyage dans un mixer M.S.E. dont le gobelet est entouré de glaçons pour éviter un réchauffement nocif.

Dans tous les cas, le broyage s'effectue après addition d'un poids de sulfate d'ammonium égal au 1/4 du poids de tissu et de quelques centimètres cubes d'alcool éthylique à 80 %.

Le broyat obtenu est ensuite extrait à trois reprises avec de l'alcool éthylique à 80 % (100 ml  $\times$  3) et une fois avec de l'alcool éthylique absolu (50 ml).

Les extraits alcooliques combinés sont gardés au frigidaire pendant 24 heures et filtrés sur papier filtre. Ils sont évaporés sous pression réduite et en atmosphère d'azote grâce à un évaporateur rotatif, et le résidu est porté à un volume de 50 ml par addition d'eau distillée.

La phase aqueuse est ensuite extraite trois fois avec 50 ml d'éther éthylique fraîchement redistillé. On ajoute aux extraits étherés mélangés 50 ml de toluène (extrait éther-toluène I, correspondant aux œstrogènes libres après déprotéinisation).

**2° Hydrolyse.** — Le résidu aqueux contenant les œstrogènes conjugués auquel on ajoute les fragments tissulaires restant après filtration de l'extrait alcoolique est hydrolysé à pH 4,5 par le suc d'*Hélix Pomatia* (50.000 unités de  $\beta$ -glucuronidase, 25.000 unités de sulfatase) à l'étuve à 37° pendant 24 heures.

La solution aqueuse est ensuite extraite comme précédemment par l'éther (50 ml  $\times$  3) auquel on ajoute 50 ml de toluène (extrait éther-toluène II).

Le résidu aqueux est enfin hydrolysé par HCl à chaud (7,5 ml) pendant 20 minutes à reflux et extrait par l'éther après refroidissement. On ajoute comme précédemment 50 ml de toluène aux extraits étherés mélangés (extrait éther-toluène III).

TABLEAU V bis. — RÉSUMÉ SCHÉMATIQUE DE LA TECHNIQUE DE DOSAGE DES ŒSTROGÈNES TISSULAIRES.

## a) HYDROLYSE ET EXTRACTION

Broyage - extraction par alcool éthylique

Evaporation

Mise en solution aqueuse

Extraction par l'éther puis le  
toluène (œstrogènes libres)  
(I)Hydrolyse enzymatique du  
résidu aqueux par le suc  
d'*Helix pomatia*  
Extraction par éther-toluène (II)Hydrolyse acide du résidu  
aqueux  
Extraction par éther-toluène  
(III)

## b) PURIFICATION DES FRACTIONS LIBRES ET CONJUGUÉES

Solution éthéro-toluénique

Extraction par NaOH-N

Extraction par l'éther à pH 10,3

Evaporation - dissolution dans ben-  
zène-éther de pétrole

Extrait éthéro-benzénique

Extraction par l'eau

Extrait éthéro-benzénique :

Extrait aqueux :

Fraction œstrone-œstradiol

Fraction œstriol

Saponifica-  
tion dans  
NaOH-NExtraction  
par l'éther  
lavagesExtraction  
par l'éther  
après addi-  
tion de  
 $\text{PO}_4\text{HNa}_2$ Chromatographie sur célite  
Phase stationnaire : NaOH  
Phase mobile : benzène-éther de  
pétrole, puis benzèneChromatographie sur célite  
Phase stationnaire : méthanol  
70 %  
Phase mobile : dichlorure  
d'éthylèneMesure des œstrogènes d'après leur fluorescence dans  $\text{SO}_2\text{H}_2$  à 88 %

Les deux fractions conjuguées ainsi hydrolysées peuvent être ou non mélangées suivant les cas.

Nous avons légèrement modifié la technique de Diczfalusy et Magnusson, remplaçant l'extraction des solutions aqueuses avec le toluène par l'addition de celui-ci aux extraits éthérés.

En effet, nous avons constaté que les œstrogènes libres ou hydrolysés étaient suffisamment épuisés avec trois extractions successives par l'éther et que l'extraction par le toluène entraînait des impuretés supplémentaires. Cependant son addition aux extraits étherés est extrêmement utile car, comme l'avaient constaté Diezfalusy et ses collaborateurs, le toluène retient ultérieurement une grande partie des impuretés et surtout des lipides. Nous avons également introduit ce temps supplémentaire pour le dosage des œstrogènes dans le sang de certains poissons très riches en lipides.

**3° Purification des extraits éthéro-toluéniques.** — Les différents extraits éthéro-toluéniques sont ensuite traités de la même façon.

L'éther est évaporé sous pression réduite, le résidu toluénique est réextrait par trois fois 20 ml de soude normale. L'agitation doit être faite très lentement dans un agitateur automatique pour éviter les émulsions, et la décantation doit être suffisamment prolongée pour être complète. Les fractions sodiques réunies sont ajustées à pH 10,3 par une solution saturée de sulfate d'ammonium, puis réextraites par trois fois 50 ml d'éther.

Les extraits étherés sont lavés par 5 ml de solution de bicarbonate de soude saturée, puis par de l'eau distillée jusqu'à neutralité (habituellement  $3 \times 5$  ml).

Les extraits étherés sont traités ensuite comme pour le dosage des œstrogènes sanguins, c'est-à-dire qu'ils sont évaporés à sec avant d'être séparés en deux fractions œstrone-œstradiol et œstriol, par partage entre benzène-éther de pétrole et  $H_2O$ .

Les diverses fractions phénoliques fortes et phénoliques faibles (libres et conjuguées) obtenues sont enfin purifiées et chromatographiées sur colonne de célite avant d'être dosées par mesure de la fluorescence à chaud dans  $SO_4H_2$  à 88 %.

Nous avons effectué les vérifications méthodologiques habituelles (sensibilité, précision, exactitude, spécificité) sur les tissus que nous avons spécialement étudiés, en particulier la muqueuse utérine.

## CHAPITRE II

# RÉSULTATS

## I. — VARIATIONS DES ŒSTROGÈNES SANGUINS AU COURS DE CERTAINS ÉTATS PHYSIOLOGIQUES

### Grossesse normale

**1° Résultats personnels.** — Nous avons effectué le dosage des trois fractions œstrogéniques principales dans le sang veineux périphérique de femmes enceintes pour la plupart normales. Un certain nombre d'entre elles cependant avaient des antécédents d'avortement spontané.

Nous n'avons malheureusement pas pu, le plus souvent, répéter les examens régulièrement chez les mêmes femmes, et nous rapportons ici les valeurs moyennes de 78 dosages dont un grand nombre effectués en double (tableau VI).

TABLEAU VI. — DOSAGE DES ŒSTROGÈNES DANS LE SANG VEINEUX PÉRIPHÉRIQUE PENDANT LA GROSSESSE.

Exprimés en  $\mu\text{g}$  par 100 ml de sang.

| Terme                | Œstrone<br>(valeur moyenne<br>$\pm$ déviation<br>standard) | Œstradiol<br>(valeur moyenne<br>$\pm$ déviation<br>standard) | Œstriol<br>(valeur moyenne<br>$\pm$ déviation<br>standard) |
|----------------------|------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| 4 à 8 semaines ...   | (14)* 2,1 $\pm$ 1,3                                        | (14) 0,9 $\pm$ 1,0                                           | (15) 1,9 $\pm$ 1,2                                         |
| 8 à 12 semaines ...  | (10) 3,1 $\pm$ 1,8                                         | (10) 0,8 $\pm$ 0,5                                           | (10) 2,7 $\pm$ 2,3                                         |
| 12 à 16 semaines ... | ( 8) 2,4 $\pm$ 2,1                                         | ( 8) 1,3 $\pm$ 1,2                                           | ( 8) 2,8 $\pm$ 1,6                                         |
| 16 à 24 semaines ... | (10) 2,7 $\pm$ 1,4                                         | (10) 1,4 $\pm$ 1,4                                           | (10) 3,5 $\pm$ 3,1                                         |
| 24 à 28 semaines ... | (12) 2,9 $\pm$ 2,3                                         | (12) 1,5 $\pm$ 1,3                                           | (12) 3,6 $\pm$ 1,6                                         |
| 28 à 32 semaines ... | ( 9) 3,5 $\pm$ 3,1                                         | ( 9) 1,3 $\pm$ 0,4                                           | ( 8) 3,9 $\pm$ 1,2                                         |
| 32 à 36 semaines ... | ( 8) 4,6 $\pm$ 4,2                                         | ( 8) 1,3 $\pm$ 1,0                                           | ( 8) 5,0 $\pm$ 2,4                                         |
| 36 à 40 semaines ... | ( 7) 5,1 $\pm$ 2,7                                         | ( 7) 2,3 $\pm$ 1,5                                           | ( 5) 4,7 $\pm$ 3,1                                         |

\* Les valeurs exprimées entre parenthèses indiquent le nombre de dosages effectués.

Les écarts individuels étant très importants et le nombre de dosages assez limité, nous pensons qu'il serait prématuré de se livrer ici à des calculs statistiques afin de délimiter l'aire normale de variation. Nous nous contenterons donc de mentionner la moyenne arithmétique et la déviation

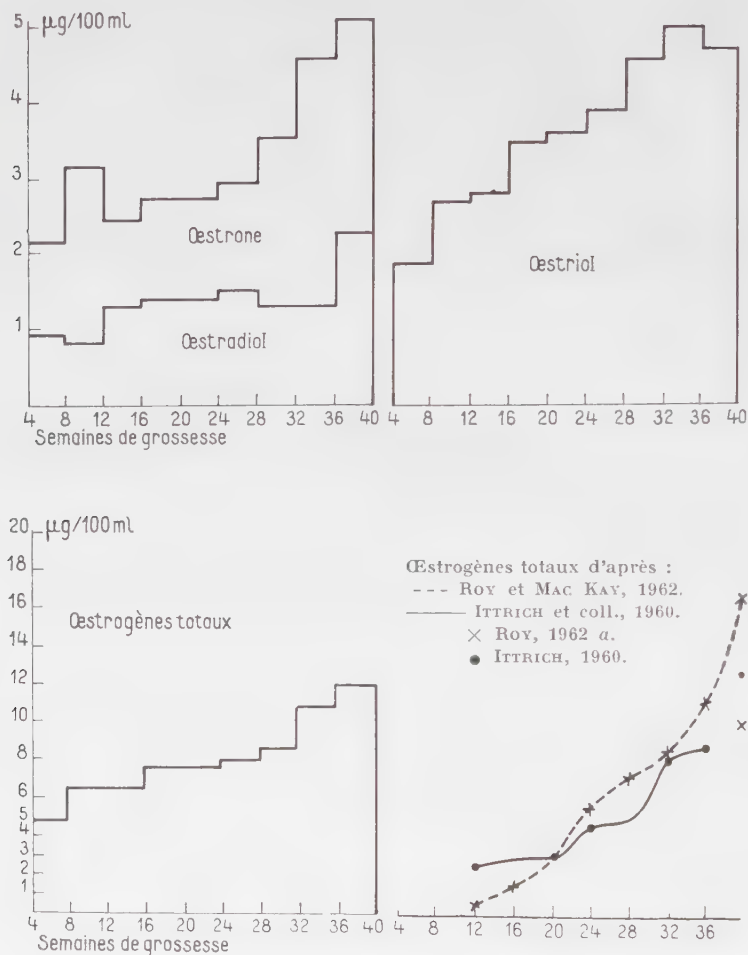


FIG. 13.

Taux moyen des œstrogènes sanguins au cours de la grossesse normale.

standard aux différentes périodes de la grossesse. On peut constater, comme le montre la figure 13, une élévation régulière et progressive de l'œstrone et de l'œstriol dans le sang veineux périphérique.

A partir de la 8<sup>e</sup> semaine de la grossesse, les taux sont déjà très nettement supérieurs à ceux que l'on peut observer en phase lutéale du cycle,

et s'élèvent ensuite régulièrement, atteignant une valeur moyenne voisine de 5  $\mu\text{g}$  dans les dernières semaines de la grossesse.

L'œstradiol par contre ne s'élève que plus lentement et beaucoup plus modérément, restant pratiquement toujours inférieur à 2  $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ .

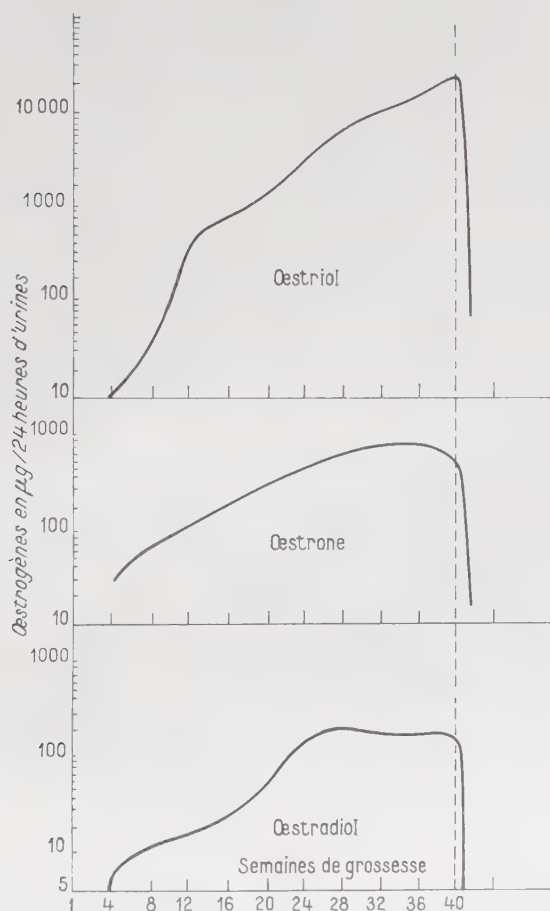


FIG. 14.

*Élimination urinaire moyenne des œstrogènes pendant la grossesse.*

On peut aisément constater que l'accroissement des œstrogènes sanguins est très modéré en comparaison de l'augmentation considérable des œstrogènes urinaires (tableau VII) (fig. 14).

Ceci est surtout net pour l'œstriol dont l'élimination urinaire représente en fin de grossesse 90 % de l'excrétion totale, alors que dans le sang sa

TABLEAU VII. — ELIMINATION DES ŒSTROGÈNES URINAIRES  
AU COURS DE LA GROSSESSE NORMALE.  
Exprimée en  $\mu\text{g}$  24 heures.

|                       | Œstrone | Œstradiol | Œstriol  |
|-----------------------|---------|-----------|----------|
| 4 - 5 semaines .....  | 23,4    | 5,5       | 36,3     |
| 6 semaines .....      | 61,8    | 10,6      | 72,8     |
| 8 - 12 semaines ....  | 73,1    | 10,0      | 215,4    |
| 12 - 16 semaines .... | 172,5   | 18,2      | 631,1    |
| 16 - 20 semaines .... | 227,1   | 53,5      | 971,7    |
| 20 - 24 semaines .... | 364,0   | 106,0     | 2.371,0  |
| 24 - 28 semaines .... | 750,0   | 131,0     | 4.925,0  |
| 28 - 32 semaines .... | 758,0   | 124,0     | 6.940,0  |
| 32 - 36 semaines .... | 750,0   | 111,0     | 11.380,0 |
| 36 - 40 semaines .... | 682,0   | 128,0     | 20.530,0 |

(Ce tableau représente les valeurs moyennes obtenues après 75 dosages effectués chez 18 femmes suivies plus ou moins régulièrement et ayant mené leur grossesse à terme.)

concentration est voisine de celle de l'œstrone. Ce fait a frappé tous les auteurs qui se sont intéressés aux œstrogènes sanguins.

Brown, Saffan et Preedy (1960) ont étudié plus précisément la clearance des œstrogènes chez sept femmes enceintes au cours du 9<sup>e</sup> mois.

Les rapports  $\frac{\text{concentration urinaire}}{\text{concentration plasmatique}}$  de l'œstrone, de l'œstradiol-17 $\beta$  et de l'œstriol étaient respectivement : 3,3, 2,5 et 64,2.

La clearance moyenne de l'œstriol est d'environ 296 ml/minute, soit approximativement deux fois la filtration glomérulaire habituelle dans la grossesse. Les auteurs en concluent que dans la grossesse avancée une partie de l'œstriol plasmatique est sécrétée par les tubules rénaux (probablement le glucosiduronate d'œstriol) (1).

2° *Données de la littérature et discussion.* - Il est actuellement possible de comparer les résultats que nous avons obtenus avec ceux d'un certain nombre d'auteurs (tableau VIII).

Les techniques employées sont variables et le nombre de cas étudiés souvent limité, ce qui rend difficile une interprétation strictement quantitative des résultats. Il faut en effet signaler que, lors des publications succes-

(1) On sait maintenant que les œstrogènes sanguins, sauf l'œstradiol, sont essentiellement sous forme conjuguée (Cedard et Diezfalusy, 1962; Schwerts, 1964; Touchstone et collaborateurs, 1963), mais la nature de ces conjugués n'est pas entièrement connue.

sives effectuées par les mêmes auteurs et avec les mêmes techniques, les valeurs obtenues diffèrent selon le nombre de femmes examinées.

Un certain nombre de conclusions peuvent cependant être tirées de ces recherches.

A part les faibles concentrations calculées par Svendsen (1960) d'après une méthode de double dilution isotopique sans hydrolyse, les résultats sont tous du même ordre de grandeur.

Dans tous les cas (sauf Oertel, West et Eik-Nes sur un pool de plasma au 3<sup>e</sup> trimestre), l'œstradiol est de loin le moins abondant des œstrogènes sanguins.

La plupart des auteurs ont utilisé le plasma, or celui-ci ne représente qu'approximativement la moitié du volume sanguin alors qu'il contient la plupart des œstrogènes.

C'est ce qui explique par exemple que les valeurs obtenues par Preedy et collaborateurs (1957, 1958, 1960) sont dans l'ensemble plus élevées que les nôtres.

Ittrich, par contre, ainsi que Miss Roy utilisent comme nous le sang total, et la figure 13 montre que la valeur totale des œstrogènes sanguins obtenue par Miss Roy est très voisine de la nôtre à partir de la 24<sup>e</sup> semaine, en dépit de la différence des méthodes de mesure employées.

De même la courbe que nous obtenons est strictement parallèle à celle d'Ittrich et collaborateurs (1960 b), quoique plus élevée au départ. Dans un autre article (1960 a), Ittrich cite par ailleurs des valeurs au 9<sup>e</sup> mois nettement supérieures et identiques aux nôtres :

|           |                                 |
|-----------|---------------------------------|
| Œstrone   | $5,6 \pm 0,9$ µg/100 ml         |
| Œstradiol | $1,8 \pm 0,7$ µg/100 ml         |
| Œstriol   | $4,8 \pm 1,8$ µg/100 ml (5 cas) |

alors qu'à ce terme nous avons obtenu (1) :

|           |                                  |
|-----------|----------------------------------|
| Œstrone   | $5,1 \pm 2,7$ µg/100 ml          |
| Œstradiol | $2,3 \pm 1,5$ µg/100 ml          |
| Œstriol   | $4,7 \pm 3,1$ µg/100 ml (7 cas). |

**3<sup>e</sup> Dosage des œstrogènes au cours des accouchements ou des césariennes.** — Nous n'avons pas personnellement étudié les œstrogènes sanguins au cours de l'accouchement et des césariennes, ni les modifications survenant à l'approche du terme, mais il existe actuellement un certain nombre de résultats qu'il nous semble intéressant de citer.

Ittrich (1960 a) a constaté une augmentation des trois fractions œstrogéniques du sang au cours du travail (11,45 µg/100 ml en début de travail,

---

(1) Après la rédaction de cet ouvrage, nous avons pris connaissance du travail très intéressant de Schwes (1964) qui comporte une étude statistique des œstrogènes urinaires et plasmatiques au cours de la seconde moitié de la grossesse normale et pathologique.

TABLEAU VIII. — TAUX DES GESTROGÈNES SANGUINS AU COURS DE LA GROSSESSE NORMALE  
ET DE L'ACCOUCHEMENT OBTENUS PAR LES AUTRES AUTEURS.  
Exprimés en  $\mu\text{g}$  100 ml de sang total ou de plasma (moyennes arithmétiques entre parenthèses).

| Auteurs                                             | Méthode employée | Mesure dans : | Nombre de cas | Œstrone            | Œstradiol          | Œstriol             | Moment                                 |
|-----------------------------------------------------|------------------|---------------|---------------|--------------------|--------------------|---------------------|----------------------------------------|
| I. — GROSSESSE NORMALE (sang veineux périphérique). |                  |               |               |                    |                    |                     |                                        |
| Veldhuis (1953) .....                               | Fluorimétrie     | Plasma        | 3             | 2,1 à 3,3          |                    | 1,0 à 1,6           | 7 à 8 mois                             |
| Heugshem (1957) .....                               | Fluorimétrie     | Plasma        | 10            | 0 — 5              |                    | 2 — 15              | 2 à 9 mois                             |
| Preedy et Attken (1957) .....                       | Fluorimétrie     | Plasma        | 6             | 2,6 — 10,3         | 1,3 — 2,9          | 4,3 à 17,5          | 38 <sup>e</sup> à 42 <sup>e</sup> sem. |
| Slaunwhite et Sandberg (1959) .....                 | C.C.D.           | Plasma        | 1             | 5,1                | < 1,4              | 4,3                 | 14 <sup>e</sup> à 27 <sup>e</sup> sem. |
|                                                     | Chromat. papier  | Plasma        | 1             | 3,1                | < 0,1              | 5,1                 | 28 <sup>e</sup> à 35 <sup>e</sup> sem. |
|                                                     | Fluorimétrie     | Plasma        | 1             | 9,3                | 8,2                | 6,1                 | 36 <sup>e</sup> à 45 <sup>e</sup> sem. |
| Oertel, West et Eik-Nes (1959) .....                | C.C.D.           | Plasma        | 1             | 5,2                | 3,3                | 2,9                 | 3 <sup>e</sup> trimestre               |
|                                                     | Chromat. papier  |               |               |                    |                    |                     |                                        |
|                                                     | Colorimétrie     |               |               |                    |                    |                     |                                        |
| Brown (C.H.), Saffan et Preedy (1960) .....         | Fluorimétrie     | Plasma        | 9             | 1,5 — 16,3         | < 0,05 — 1,8       | 2,1 — 11,6          | 32 <sup>e</sup> à 40 <sup>e</sup> sem. |
| Roy et Brown (1960) ..                              | Colorimétrie     | Sang          | 19            | 0,5 — 9,0<br>(5,0) | 0,2 — 1,7<br>(1,0) | 2,3 — 19,6<br>(7,8) | 36 <sup>e</sup> sem. à terme           |
| Svendsen (1960) .....                               | Double dilution  |               |               |                    |                    |                     |                                        |
|                                                     | Isotopique       | Sang          |               | (0,1 — 1,0)        | (0,2 — 3,0)        |                     |                                        |
| Ittrich et coll. (1960) ..                          | Colorimétrie     | Sang          | 26            | 0,6 — 5,0          | 0,2 — 2,4          | 0,2 — 6,5           | De 3 à 9 mois                          |
| Ittrich (1960) .....                                | Colorimétrie     | Sang          | 5             | (5,6 $\pm$ 0,9)    | (1,8 $\pm$ 0,7)    | (4,8 $\pm$ 1,8)     | A 9 mois                               |
| Roy et Mc Kay (1962) ..                             | Colorimétrie     | Sang          | 29            | (4,68 $\pm$ 1,90)  | (1,23 $\pm$ 0,37)  | (9,16 $\pm$ 3,78)   | 37 <sup>e</sup> à 42 <sup>e</sup> sem. |
| Keller (1961) .....                                 | Fluorimétrie     | Plasma        | 65            | (4,5 — 17,0)       |                    | (5,0 — 21,5)        | Dernier tiers grossesse                |
| Schwens (1964) .....                                | Colorimétrie     | Plasma        | 12            | 1,93               | 1,27               | 14,2                | A terme                                |

II. — ACCOUCHEMENT NORMAL.

|                      |                 |        |   |  |  |           |                    |
|----------------------|-----------------|--------|---|--|--|-----------|--------------------|
| Touchstone et Greene | Chromat. papier | Plasma | 6 |  |  | 4,0 — 6,0 | Sang veineux nati- |
|----------------------|-----------------|--------|---|--|--|-----------|--------------------|

| Short (1958)                                                | Fluorimétrie | Plasma | 14 | 1,3 - 25,4  | 0,05 - 1,85 | 5,0 - 18,1  | Sang veineux péri-phérique                         |
|-------------------------------------------------------------|--------------|--------|----|-------------|-------------|-------------|----------------------------------------------------|
| Saffan et Preedy (1960).<br>in O'Donnel et Preedy<br>(1961) | Fluorimétrie | Plasma | 14 | 1,3 - 25,4  | 0,05 - 1,85 | 5,0 - 18,1  | Sang veineux péri-phérique                         |
| Ittrich (1960)                                              | Colorimétrie | Sang   | 6  | (7,7 ± 2,5) | (2,2 ± 0,5) | (8,3 ± 4,7) | Sang veineux péri-phérique - période de dilatation |

## III. — CÉSARIENNE.

|                                   |              |        |    |               |              |               |                                |
|-----------------------------------|--------------|--------|----|---------------|--------------|---------------|--------------------------------|
| Aitken, Preedy et coll.<br>(1958) | Fluorimétrie | Plasma | 5  | 12,8 - 43,0   | 1,6 - 3,7    | 17,8 - 41,6   | Sang veineux péri-phérique     |
| Saffan, Brown et Preedy<br>(1960) | Fluorimétrie | Plasma | 9  | 0,3 - 9,1     | < 0,05 - 1,3 | 3,8 - 18,1    | Artère brachiale<br>maternelle |
| Roy (1962 a)                      | Fluorimétrie | Plasma | 7  | 0,8 - 8,1     | 0,9 - 6,9    | 4,1 - 18,2    | Veine utérine                  |
|                                   | Colorimétrie | Sang   | 12 | (1,99 ± 1,32) | (0,5 ± 0,21) | (6,73 ± 4,67) | Sang veineux péri-phérique     |
|                                   | Colorimétrie | Sang   | 12 | (2,53 ± 1,65) | (1,3 ± 0,7)  | (8,70 ± 5,76) | Veine utérine                  |

## IV. — CORDON OMBILICAL.

|                                   |              |        |    |               |                 |              |                   |
|-----------------------------------|--------------|--------|----|---------------|-----------------|--------------|-------------------|
| Diczfalusy et Magnusson<br>(1958) | Colorimétrie | Sang   | 9  | 0 - 2,3 (1,3) | 0,1 - 1,3 (0,6) | 39 - 68 (58) | Sang du cordon    |
| Aitken, Preedy et coll.<br>(1958) | Fluorimétrie | Plasma | 5  | 2,0 - 3,2     | < 0,25 - 1,2    | 61,5 - 190,9 | Sang du cordon    |
| Roy et Brown (1960)               | Colorimétrie | Sang   | 22 | (1,5 ± 0,2)   | (0,6 ± 0,4)     | (49 ± 12)    | Sang du cordon    |
|                                   | Colorimétrie | Sang   | 5  | (3,6 ± 1,8)   | (2,0 ± 1,3)     | (73 ± 21)    | Veine ombilicale  |
| Ittrich (1960)                    | Colorimétrie | Sang   | 12 | (0,6 ± 0,3)   | (0,3 ± 0,2)     | (55 ± 26)    | Veine ombilicale  |
|                                   | Colorimétrie | Sang   | 13 | (0,5 ± 0,5)   | (0,3 ± 0,2)     | (54 ± 22)    | Artère ombilicale |
| Roy (1962 a)                      | Colorimétrie | Plasma | 16 | (1,91)        | (0,41)          | (103,2)      | Artère ombilicale |
|                                   | Colorimétrie | Plasma | 16 | (2,81)        | (0,64)          | (102,0)      | Veine ombilicale  |
| Maner, Saffan et coll.<br>(1963)  | Fluorimétrie |        |    |               |                 |              |                   |
|                                   | Fluorimétrie |        |    |               |                 |              |                   |

18,2  $\mu\text{g}/100\text{ ml}$  pendant la période de dilatation). Mais le nombre limité des cas étudiés ne permet pas de conclusion définitive.

Miss Roy a plus particulièrement étudié ces problèmes, elle a d'ailleurs noté une baisse des œstrogènes sanguins, surtout de l'œstrone, au cours de l'hospitalisation, ce qui explique la différence considérable et statistiquement significative entre la concentration en œstrogènes dans le sang veineux périphérique d'une première série de femmes enceintes à terme et ambulatoires (Roy et McKay, 1960) et une deuxième série de femmes hospitalisées quelques jours avant pour césarienne (Roy, 1962 b).

Maner et collaborateurs (1963) ont, comme Miss Roy, étudié longuement les différences entre les œstrogènes du sang maternel et du sang fœtal (sang du cordon).

Nous n'insisterons pas sur les résultats obtenus que nous avons énumérés en détail dans le tableau VIII, mais nous signalerons simplement que tous les auteurs constatent un taux plus élevé de l'œstriol dans le sang du cordon, alors que, par contre, l'œstrone et l'œstradiol y sont moins abondants que dans le sang périphérique de la mère.

Maner et collaborateurs (1963) constatent des taux d'œstrone et d'œstradiol plus élevés dans la veine que dans les artères ombilicales, alors que Roy (1962 a) n'y observe pas de différence.

Les différences entre le sang périphérique et le sang veineux utérin sont surtout nettes pour l'œstradiol et l'œstriol (Roy, 1962; Saffan, Brown, Preedy, 1960), indiquant une nette libération de ces hormones par l'utérus gravide, insuffisante cependant à expliquer l'importance de l'élimination urinaire d'œstriol dans la grossesse à terme (Maner et collaborateurs, 1963).

### *Cycle menstruel*

1° Nous avons effectué 28 dosages au cours du cycle menstruel chez des femmes normales, membres du personnel hospitalier, qui ont bien voulu se mettre à notre disposition. Les prises de sang furent effectuées à deux reprises vers le 8<sup>e</sup> et le 24<sup>e</sup> jour, au cours d'un cycle ou de deux cycles successifs.

Nous avons ainsi pu confirmer, dans presque tous les cas, l'absence d'œstriol en phase folliculaire dans le sang, et sa présence quasi constante en phase lutéale (une seule femme n'en avait pas au 26<sup>e</sup> jour, soit 48 heures avant les règles, alors que nous en avons trouvé au 21<sup>e</sup> jour lors du cycle suivant).

En phase folliculaire, il existe le plus souvent des traces d'œstrone (valeur moyenne  $0,7 \pm 0,2\ \mu\text{g}/100\text{ ml}$ ), beaucoup plus rarement d'œstradiol (valeur moyenne  $0,2 \pm 0,17\ \mu\text{g}/100\text{ ml}$ , soit pratiquement nulle).

En phase lutéale, par contre, on en trouve presque toujours et la diffé-

TABLEAU IX. DOSAGE DES ŒSTROGÈNES SANGUINS EN DEHORS DE LA GROSSESSE. *Exprimés en µg/100 ml de sang.*

I. — CYCLE MENSUEL.

|                                                                                                                              | Phase folliculaire                 |                                 |                                | Phase lutéale                          |                                   |                                                              |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------|
|                                                                                                                              | Œstrone                            | Œstradiol                       | Œstriol                        | Œstrone                                | Œstradiol                         | Œstriol                                                      |
| Femmes normales (volontaires) . . . .                                                                                        | 8 positifs<br>2 nuls<br>0,7 ± 0,5  | 5 positifs<br>5 nuls<br>± nul   | Tous nuls<br>sauf 1<br>nul     | Tous posi-<br>tifs sauf 1<br>1,4 ± 0,8 | Tous posi-<br>tifs<br>0,6 ± 0,5   | Tous positifs<br>sauf 1 au 26 <sup>e</sup> jour<br>1,1 ± 0,6 |
| Moyenne ± déviation standard . . . .                                                                                         | (51)                               | (51)                            | (55)                           | (60)                                   | (60)                              | (60)                                                         |
| Troubles gynécologiques divers sans anomalies endocriniennes ni mé-<br>trorragies (femmes âgées de 23 à<br>43 ans) . . . . . | 43 positifs<br>8 nuls<br>1,5 ± 1,6 | 18 positifs<br>33 nuls<br>< 0,5 | 9 positifs<br>46 nuls<br>< 0,5 | 59 positifs<br>1 nul<br>2,3 ± 1,4      | 53 positifs<br>7 nul<br>0,9 ± 0,9 | 56 positifs<br>4 nuls<br>2,2 ± 1,7                           |
| Moyenne ± déviation standard . . . .                                                                                         |                                    |                                 |                                |                                        |                                   |                                                              |

II. — FEMMES MÉNOPAUSÉES : 15 femmes âgées de 54 à 77 ans.

|                                        | Œstrone                            | Œstradiol                      | Œstriol                  |
|----------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|--------------------------|
|                                        | 10 positifs<br>5 nuls<br>0,5 ± 0,4 | 5 positifs<br>10 nuls<br>± nul | Toujours nuls<br><br>Nul |
| Moyenne ± déviation standard . . . . . |                                    |                                |                          |

III. — HOMMES : 11 hommes normaux âgés de 21 à 38 ans.

|                                        | Œstrone                           | Œstradiol                         | Œstriol                  |
|----------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
|                                        | 6 positifs<br>5 nuls<br>1,0 ± 0,9 | 5 positifs<br>6 nuls<br>0,5 ± 0,5 | Toujours nuls<br><br>Nul |
| Moyenne ± déviation standard . . . . . |                                   |                                   |                          |

(Les valeurs entre parenthèses indiquent le nombre de dosages effectués.)

TABLEAU X. — DONNÉES DE LA LITTÉRATURE SUR LE TAUX DES ŒSTROGÈNES SANGUINS EN DEHORS DE LA GROSSESSE.  
*Exprimés en  $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ .*

I. — FEMMES NON GRAVIDES ET NORMALEMENT RÉGLÉES.

| Auteurs                 | Méthode de dosage          | Prélèvement | Œstrone                        | Œstradiol   | Œstriol    | Moment                                          | Nombre de cas         |
|-------------------------|----------------------------|-------------|--------------------------------|-------------|------------|-------------------------------------------------|-----------------------|
| Nakao et Aizawa (1956)  | Fluorimétrie               | Sang        | (3,3)                          | (0,5)       | (1,4)      | Ph. lutéale                                     | 6 cas                 |
| Preedy et Aitken (1957) | Fluorimétrie               | Plasma      | (0,11)                         | < 0,07      | (0,19)     | Ph. lutéale                                     | 6 cas                 |
| Puck (1955)             | Chromatographie sur papier | Plasma      | —                              | —           | 7,5 - 40,0 | Cancer :<br>Cycle menstruel                     | 5 cas                 |
| Oertel (1961 b)         | Chromatographie sur papier | Plasma      | 0,5 - 1,5                      | 0,3 - 0,8   | 0 - 0,8    | Cycle menstruel                                 | 10 cas                |
| Roy et Brown (1960)     | Colorimétrie               | Sang        | < 0,11 - 0,13<br>- 0,18 - 0,30 | < 0,08      | < 0,18     | Cycle menstruel                                 | 6 cas                 |
| Roy (1962)              | Colorimétrie               | Sang        | 0 - 0,14                       | 0 - 0,03    | < 0,02     | Cycle menstruel                                 | 5 cas                 |
| Svendsen (1960)         | Double dilution isotopique | Plasma      | 0,01 - 0,07                    | 0,03 - 0,08 | —          | —                                               | 5 cas                 |
| Ittrich (1960)          | Colorimétrie               | Sang        | 0,6 - 1,6                      | 0,5 - 1,1   | 0,3 - 1,1  | 3 <sup>e</sup> au 16 <sup>e</sup> jour du cycle | 1 cas<br>(10 dosages) |

II. — HOMMES.

|                         |        |                |                  |        |       |
|-------------------------|--------|----------------|------------------|--------|-------|
| Preedy et Aitken (1957) | Plasma | 0,111<br>4 cas | < 0,07<br>< 0,06 | < 0,15 | 5 cas |
|-------------------------|--------|----------------|------------------|--------|-------|

(Les chiffres entre parenthèses indiquent les valeurs moyennes.)

rence est statistiquement significative entre les deux phases du cycle pour les deux fractions œstrone et œstradiol (tableau IX).

Les valeurs obtenues sont cependant, pour les trois œstrogènes, plus faibles que dans la grossesse dès la 8<sup>e</sup> semaine.

2° Une étude plus large a été entreprise ultérieurement chez des femmes âgées de 23 à 43 ans *présentant des troubles gynécologiques divers* mais sans troubles endocriniens. Les chiffres moyens sont un peu plus forts que précédemment mais les conditions de prélèvement y ont été moins strictes et en particulier les prélèvements en phase folliculaire ont parfois été effectués au voisinage de l'ovulation. Mais, dans l'ensemble, les résultats sont identiques.

En phase folliculaire, le sang ne contient dans les deux tiers des cas que des traces d'œstrone, alors qu'en phase lutéale, le sang plus riche en œstrone contient habituellement de l'œstradiol et de l'œstriol en quantités dosables.

3° Le tableau X résume les *données de la littérature*. Malheureusement, le nombre de cas publiés par chacun des auteurs est extrêmement limité et la distinction, à notre avis, essentielle entre phase folliculaire et phase lutéale n'a le plus souvent pas été faite.

Certains auteurs (Miss Roy, Svendsen) trouvent des taux très faibles. Les valeurs obtenues par Puck par fluorimétrie après chromatographie sur papier semblent en revanche pécher par excès. Ittrich par contre a obtenu des valeurs très voisines des nôtres, mais n'a malheureusement pas effectué de dosages en phase lutéale. Nous sommes d'ailleurs frappés par la discordance entre les résultats que Miss Roy a obtenus en 1962 et ceux d'Ittrich car les méthodes employées sont très voisines.

Enfin tout récemment Ichii, Forchielli et Dorfman (1963) relatent des valeurs très faibles pour l'œstrone et l'œstradiol en dehors de la grossesse (0,008 à 0,106 g/100 ml de plasma), mais comme Svendsen ils n'étudient que les œstrogènes libres qui ne constituent qu'une très faible partie des œstrogènes sanguins.

### ***Ménopause. Hommes. Aménorrhée***

1° Des dosages ont été effectués *chez 15 femmes ménopausées* âgées de 54 à 77 ans, femmes en bon état général, pour la plupart hospitalisées pour des raisons sociales dans des services de désencombrement.

Chez ces 15 femmes, l'œstrone est bas (moyenne  $0,5 \pm 0,4$  µg par 100 ml, soit à la limite de la sensibilité de la technique), l'œstradiol est nul dans les deux tiers des cas, l'œstriol toujours nul.

Il n'existe aucun résultat à ce sujet dans la littérature que nous avons consultée, on sait simplement que l'élimination urinaire des œstrogènes

reste assez importante après la ménopause, mais il est évidemment très difficile (sauf dans les études entreprises chez les femmes porteuses de cancer mammaire et qui subissent successivement : irradiation des ovaires, castration, surrénalectomie) de faire la part des sécrétions surrénaliennes et ovariennes (R. Nissen-Mayer, T. Sanner, 1962).

2° Nous avons effectué le dosage d'œstrogènes dans le sang de 12 hommes normaux et n'y avons jamais trouvé d'œstriol, l'œstrone était également absent dans 5 cas; l'œstradiol dans 6 cas.



FIG. 15. — Concentration des œstrogènes dans le sang veineux périphérique, chez les sujets normaux, en dehors de la grossesse.

Les œstrogènes sanguins sont donc chez l'homme comme chez la femme ménopausée et la femme jeune en phase folliculaire (ou tout au moins dans les premiers jours du cycle) limités à des traces d'œstrone (fig. 15).

Une pareille analogie se retrouve également dans les œstrogènes urinaires.

Seules, nous a-t-il semblé, l'ovulation et *a fortiori* la grossesse font normalement apparaître des taux notables d'œstradiol et d'œstriol dans le sang et augmentent les œstrogènes urinaires au-dessus d'une valeur que Brown et Matthew évaluent à 15 µg par 24 heures (1962).

## II. — INFLUENCE DE QUELQUES ÉTATS PATHOLOGIQUES SUR LES ŒSTROGÈNES SANGUINS

### *Stérilités féminines*

Nous avons effectué de façon systématique le dosage des œstrogènes sanguins depuis 1957 chez un grand nombre de femmes stériles examinées et traitées à la Maternité de Port-Royal.

Ces dosages ont été accompagnés d'un dosage de prégnandiol urinaire selon la méthode de Huber et de Watteville (1947) modifiée par Benard (mesure au spectrophotomètre à 420 m $\mu$  de la réaction colorée développée en présence de SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>).

Depuis 1960, nous avons également complété ce bilan hormonal par le dosage simultané des œstrogènes urinaires par fluorimétrie après hydrolyse enzymatique et chromatographie de partage.

Les examens ont été effectués sur le sang et les urines recueillis du 20<sup>e</sup> au 24<sup>e</sup> jour du cycle menstruel, si celui-ci était de 28 jours, ou plus précisément du 3<sup>e</sup> au 6<sup>e</sup> jour après le décalage thermique.

Dès le début de ce travail, nous avons été frappée par *l'absence d'œstriol dans le sang en phase lutéale chez un tiers des malades environ*. Cette proportion s'est maintenue à peu près constante depuis lors. Nous avons actuellement effectué 129 dosages chez 125 malades avec 40 dosages nuls (tableau XI).

Le tableau XI montre les valeurs moyennes de l'œstrone et de l'œstradiol sanguins, des œstrogènes urinaires totaux et du rapport  $\frac{\text{œstriol}}{\text{œstrone} + \text{œstradiol}}$  ainsi que du prégnandiol urinaire en fonction de la présence ou de l'absence d'œstriol dans le sang veineux périphérique en phase lutéale.

1° Cette étude comparative montre que, *quand l'œstriol existe en quantités dosables dans le sang veineux périphérique, l'œstradiol y est également décelé dans la plupart des cas* (41 sur 55), alors qu'il n'en existe que dans 12 cas sur 20 en l'absence d'œstriol. La différence entre les valeurs moyennes, respectivement  $0,8 \pm 0,8$   $\mu$ g par 100 ml de sang et  $0,5 \pm 0,5$   $\mu$ g par 100 ml (soit à la limite de la sensibilité de la technique), n'est cependant que faiblement significative ( $0,02 < p < 0,05$ ).

2° De même, *la valeur moyenne de l'œstrone est beaucoup plus élevée chez les malades dont le sang contient de l'œstriol* que chez les autres (respectivement  $2,2 \pm 1,8$   $\mu$ g/100 ml et  $1,1 \pm 1,1$ ). La différence entre ces valeurs moyennes est statistiquement significative ( $p = 0,02$ ).

3° Nous avons chez 78 malades pu étudier simultanément *les œstrogènes urinaires* et plus particulièrement leur valeur globale et le rapport

$$\frac{\text{œstriol}}{\text{œstrone} + \text{œstradiol}}$$

Les travaux de Brown et Matthew (1962) ont montré que, lors d'un cycle normal, il existe une élévation en clocher des trois fractions œstrogéniques contemporaine de l'ovulation, précédant de 1 à 4 jours l'élévation du prégnandiol, suivie jusqu'aux règles d'une élimination supérieure à celle observée en phase folliculaire et comprise entre 15 et 40  $\mu$ g par 24 heures. Brown considère d'autre part que l'œstriol doit être normalement supérieur ou égal à l'œstrone, l'œstradiol étant beaucoup plus bas. Diczfalusy (in

TABLEAU VI. — DOSAGES COMPARATIFS DES ŒSTROGÈNES SANGUINS ET URINAIRES ET DU PRÉGNANDIOL URINAIRE EFFECTUÉS CHEZ 125 FEMMES EN PHASE LUTÉALE.

|                                           | SANG                                                                            |                                             |                                                          | URINES                                     |                                                            |  |
|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------------------------------|--|
|                                           | Œstradiol                                                                       | Œstrone                                     | Œstrogènes totaux                                        | Œstriol<br>œstrone + œstradiol             | Prégnandiol                                                |  |
| Œstriol du sang positif<br>(89 cas) ..... | 55 dosages<br>41 cas positifs<br>14 cas nuls                                    | 57 dosages<br>54 cas positifs<br>3 cas nuls | 58 dosages<br>48 cas > 15 µg/24 h<br>10 cas < 15 µg/24 h | 58 mesures<br>48 cas > 0,6<br>10 cas ≤ 0,6 | 87 dosages<br>61 cas > 1,0 mg/24 h<br>26 cas < 1,0 mg/24 h |  |
| Moyenne ± déviation<br>standard .....     | 0,8 ± 0,8 µg/100 ml                                                             | 2,2 ± 1,8 µg/100 ml                         | 25,1 ± 11,8 µg/24 h                                      | 1,23 ± 0,61                                | 2,1 ± 1,4 mg/24 h                                          |  |
| Œstriol du sang négatif ..                | 20 dosages<br>8 cas nuls<br>12 cas positifs                                     | 19 dosages<br>4 cas nuls<br>15 cas positifs | 20 dosages<br>11 cas < 15 µg/24 h<br>9 cas > 15 µg/24 h  | 20 mesures<br>13 cas ≤ 0,6<br>7 cas > 0,6  | 36 dosages<br>17 cas < 1,0 mg/24 h<br>19 cas > 1,0 mg/24 h |  |
| Moyenne ± déviation<br>standard .....     | 0,5 ± 0,5 µg/100 ml<br>soit à la limite<br>de la sensibilité<br>de la technique | 1,1 ± 1,1 µg/100 ml                         | 16,0 ± 12,4 µg/24 h                                      | 0,54 ± 0,36                                | 1,6 ± 1,4 mg/24 h                                          |  |

La différence entre les valeurs moyennes pour les deux catégories de malades est :

- à la limite de la signification pour l'œstradiol du sang ( $t =$  variable réduite de Fisher 1,5)  $0,05 < p < 0,1$ ;
- significative pour l'œstrone du sang ( $t = 2,3$ )  $p = 0,02$ ;
- très significative pour les œstrogènes urinaires totaux ( $t = 4,5$ )  $p < 0,001$ ;
- très significative pour le rapport  
œstriol  
œstrone + œstradiol  
urinaire ( $t = 5,0$ )  $p < 0,001$ ;
- significative pour le prégnandiol urinaire ( $t = 2,1$ )  $0,02 < p < 0,05$ .

Diczfalusy et Lauritzen (1961) considère également qu'au cours du cycle menstruel normal le rapport  $\frac{\text{œstriol}}{\text{œstrone} + \text{œstradiol}}$  est égal à 1.

Nous avons pu constater dans 48 des 58 cas où existait de l'œstriol dans le sang une *élimination œstrogénique urinaire supérieure à 15 µg/24 heures*, alors qu'elle n'atteignait cette valeur que dans 11 des 20 cas où l'œstriol était indosable dans le sang. La différence entre les taux moyens (respectivement  $25,1 \pm 11,8$  et  $16,0 \pm 12,4$  µg/24 heures) chez ces deux catégories de malades est hautement significative ( $p < 0,001$ ).

De même le rapport  $\frac{\text{œstriol}}{\text{œstrone} + \text{œstradiol}}$  était supérieur à 0,6 chez 48 des 58 femmes dont le sang contenait de l'œstriol et inférieur ou égal à cette valeur, donc anormalement faible chez 13 des 20 femmes chez lesquelles l'œstriol était indosable dans le sang. Là aussi, la comparaison des valeurs moyennes ( $1,23 \pm 0,61$  et  $0,54 \pm 0,36$ ) montre une différence très significative ( $p < 0,001$ ).

4° Nous avons enfin recherché l'existence d'une corrélation entre la présence ou l'absence d'œstriol dans le sang circulant en phase lutéale et le taux du prégnandiol urinaire. 61 des 87 dosages de prégnandiol correspondant à un œstriol sanguin positif étaient supérieurs à 1 mg par 24 heures, valeur que l'on peut considérer comme à la limite inférieure de la normale avec la technique que nous employons, alors que 19 seulement des 36 dosages effectués en l'absence d'œstriol dans le sang étaient supérieurs à cette valeur. Ici aussi, la différence entre les valeurs moyennes observées dans les deux catégories de malades (respectivement  $2,1 \pm 1,4$  mg/24 heures et  $1,6 \pm 1,4$  mg/24 heures) est statistiquement significative ( $0,02 < p < 0,05$ ).

5° En regardant le tableau XI on peut constater que le groupe de 89 femmes stériles chez lesquelles nous avons trouvé de l'œstriol dans le sang en phase lutéale présente un ensemble homogène, où, dans 80 % des cas, le prégnandiol et les œstrogènes urinaires correspondaient également à l'existence d'un corps jaune en évolution.

L'examen du dossier clinique de ces malades nous a d'ailleurs permis de constater que, dans la plupart des cas, existaient également un décalage thermique régulier et des signes cytologiques d'ovulation; un certain nombre de ces malades présentaient par ailleurs une infection génitale, une obstruction tubaire ou toute autre cause décelable de stérilité. Dans quelques cas, c'est le mari qui ultérieurement a pu être tenu pour responsable de la stérilité conjugale. Nous croyons être en mesure de classer cette catégorie de malades en *stérilités non endocriniennes*.

Les résultats obtenus en l'absence d'œstriol dans le sang circulant sont nettement moins homogènes.

L'examen des dossiers gynécologiques permet d'ailleurs d'expliquer aisément ce phénomène.

En effet, chez 11 des 40 malades étudiées on retrouve des troubles ovariens indiscutables : spanioménorrhée ou périodes d'aménorrhée plus ou moins prolongées, avec décalage thermique absent ou de trop courte durée, absence de signes cytologiques d'ovulation ou ovulation tardive avec hypofolliculinie et cytolyse; la biopsie de l'endomètre a également montré dans 5 cas une muqueuse hypoplasique, voire même atrophique.

Treize autres malades, en dépit d'un cycle menstruel apparemment normal, présentaient un décalage thermique tardif ou insuffisant, un cycle de frottis vaginaux non diphasé et, dans la plupart des cas, des signes cytologiques d'hypofolliculinie (taux de pycnose et d'éosinophilie insuffisants, souvent cytolyse). Chez d'autres malades, par contre, nous n'avons pas pu déceler de troubles cliniques correspondant aux anomalies biologiques que nous avons trouvées.

Il est donc naturel que des états aussi divers se traduisent par des bilans hormonaux différents.

Il faut par ailleurs signaler que, contrairement au groupe précédent, dans la quasi-totalité des cas, l'hystéro-salpingographie était normale, et l'insufflation montrait une courbe de passage avec scapulalgies. Deux seulement de ces malades ont dû subir des interventions plastiques sur les trompes. Une seule malade a eu des inséminations artificielles (sans succès d'ailleurs).

Cinq femmes au moins sont devenues enceintes ultérieurement, dont une après résection cunéiforme des ovaires et l'autre après un traitement par les gonadotrophines chorioniques.

Nous pensons donc que l'absence d'œstriol en phase lutéale dans le sang circulant est un phénomène anormal traduisant un trouble endocrinien : anovulation, sécrétion insuffisante du corps jaune ou peut-être anomalie du métabolisme des œstrogènes au niveau de l'endomètre lui-même.

A la lumière des résultats que nous avons obtenus, nous croyons être en mesure d'affirmer que le dosage des œstrogènes et plus particulièrement de l'œstriol dans le sang veineux périphérique est un excellent moyen de diagnostic dans les stérilités féminines, au même titre que celui des œstrogènes urinaires. Ce dosage ne présente d'ailleurs pas plus de difficultés que le dosage urinaire. En effet, celui-ci n'a de valeur au cours du cycle menstruel que s'il est fractionné et spécifique (méthode de Brown par exemple). La technique que nous utilisons pour le dosage des œstrogènes sanguins n'est donc ni plus longue ni plus délicate que les méthodes correctes de dosage des œstrogènes urinaires. Le dosage dans le sang permet en outre d'éliminer les causes d'erreurs dues à une mauvaise collecte d'urines malheureusement fréquente.

Le dosage des œstrogènes sanguins peut être utilisé également lors des tests de stimulation par les gonadotrophines chorioniques que préconisent Jayle et collaborateurs (1956). Nous avons constaté chez quelques malades après stimulation ovarienne une augmentation des œstrogènes sanguins aussi

bien que des œstrogènes urinaires. Nous avons également pu constater une normalisation du bilan hormonal après un traitement par le cortancyl.

Il faut toutefois signaler que l'alternance chez certains malades de cycles ovulatoires et anovulatoires doit rendre très prudent dans l'interprétation des résultats et inciter si on a quelque doute à examiner deux ou plusieurs cycles consécutifs.

### *Fibromes utérins*

Nous avons eu l'occasion, en collaboration avec le professeur agrégé Granjon et le docteur Yannotti (1961), d'étudier le sang veineux périphérique de femmes porteuses de fibromyomes utérins. Contemporains de la période d'activité génitale, les fibromyomes utérins posent en effet le problème de leurs relations avec les hormones ovariennes.

1° Les dosages ont été effectués chez 17 femmes en période d'activité génitale, âgées de 24 à 49 ans, avant l'intervention chirurgicale. Quinze dosages ont été effectués en phase folliculaire, 5 en phase lutéale. Cinq femmes ménopausées âgées de 50 à 65 ans et se plaignant de métrorragies dues à un fibrome utérin ont également été étudiées. Le tableau XII montre que chez les 17 femmes en période d'activité génitale la valeur moyenne de l'œstrone est de 3,1  $\mu\text{g}$  par 100 ml en phase folliculaire, 3,8  $\mu\text{g}$ /100 ml en phase lutéale. La valeur moyenne de l'œstradiol est de 1,2  $\mu\text{g}$ /100 ml en phase folliculaire (tous les dosages étant positifs, sauf 1) et de 0,6  $\mu\text{g}$ /100 ml en phase lutéale.

L'œstriol est également présent dans presque tous les cas en phase folliculaire aussi bien qu'en phase lutéale.

Chez les 5 femmes ménopausées, tous les dosages d'œstrone sont positifs, la moyenne étant de 4,7  $\mu\text{g}$ /100 ml, donc considérable. Quatre dosages d'œstradiol sont positifs, le chiffre moyen étant de 2,1  $\mu\text{g}$ . On a toujours retrouvé de l'œstriol au taux moyen de 1,5  $\mu\text{g}$  par 100 ml. Nous avons été frappés des taux élevés des œstrogènes sanguins retrouvés chez ces malades. Il existe en effet dans presque tous les cas une hyperœstrogénie considérable et permanente. Elle se marque chez les femmes jeunes par une élévation de l'œstrone et la présence d'œstradiol et d'œstriol dès la phase folliculaire. Chez les femmes ménopausées, elle se caractérise par des taux élevés d'œstrone et d'œstradiol et, là encore, la présence d'œstriol tout à fait anormale après la ménopause (et retrouvée d'ailleurs dans les quelques cas de métrorragies post-ménopausiques par cancer utérin ou toute autre cause que nous avons eu la possibilité d'étudier).

2° Nous n'avons certes pas le dessein d'apporter des arguments à la théorie de l'hyperœstrogénie dans la genèse des fibromes utérins.

Tout au plus pensons-nous pouvoir confirmer l'existence d'un trouble du métabolisme des œstrogènes chez ces malades. Cette hyperœstrogénémie peut

en effet s'expliquer par une surproduction ou une viciation métabolique gênant la dégradation des œstrogènes.

TABLEAU XII. — DOSAGE DES ŒSTROGÈNES DANS LE SANG VEINEUX PÉRIPHÉRIQUE DE FEMMES PORTEUSES DE FIBROMES UTÉRINS.

Œstrogènes en  $\mu\text{g}$  par 100 ml de sang.

| I. — EN PÉRIODE D'ACTIVITÉ GÉNITALE : 17 cas de 29 à 49 ans. |                                                     |                       |                                        |                  |                                |                       |
|--------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------|----------------------------------------|------------------|--------------------------------|-----------------------|
|                                                              | Phase folliculaire<br>ou en période de métrorragies |                       |                                        | Phase lutéale    |                                |                       |
|                                                              | Œstrone<br>(15)                                     | Œstradiol<br>(15)     | Œstriol<br>(15)                        | Œstrone<br>(5)   | Œstradiol<br>(5)               | Œstriol<br>(5)        |
|                                                              | Tous positifs                                       | Tous positifs, sauf 1 | 13 positifs<br>2 nuls                  | Positifs, sauf 1 | Tous positifs, sauf 1          | Tous positifs, sauf 1 |
| Moyenne $\pm$ déviation standard .....                       | 3,1 $\pm$ 1,5                                       | 1,2 $\pm$ 1,1         | 3,3 $\pm$ 2,3                          | 3,8 $\pm$ 1,7    | 0,6 $\pm$ 0,3                  | 1,2 $\pm$ 0,7         |
| II. — APRÈS LA MÉNOPAUSE : 5 cas de 50 à 65 ans.             |                                                     |                       |                                        |                  |                                |                       |
|                                                              | Œstrone                                             |                       | Œstradiol                              |                  | Œstriol                        |                       |
| Moyenne $\pm$ déviation standard .....                       | Tous positifs<br>4,7 $\pm$ 2,2                      |                       | Tous positifs, sauf 1<br>2,1 $\pm$ 1,9 |                  | Tous positifs<br>1,5 $\pm$ 1,2 |                       |

(Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de dosages effectués.)

Plusieurs travaux récents appuient d'ailleurs cette hypothèse :

Outchnikova et Sytch (1959) se fondant sur des dosages urinaires pensent que, par suite d'une insuffisance en progestérone, le métabolisme des œstrogènes se poursuit incomplètement chez les fibromateuses, amenant leur accumulation qui ne se reflétera que secondairement dans l'élimination urinaire. Ainsi les dosages dans le sang saisiraient-ils le trouble à son début.

Moracci (1949) et, après lui, Gerli (1959), administrant 20.000 U.I. de benzoate d'œstradiol à des fibromateuses, ont constaté sur la foi des dosages dans les urines qu'il existe une rétention de l'œstradiol dans l'organisme non retrouvée chez les femmes témoins, ce qui confirmerait encore le trouble de dégradation des œstrogènes chez les fibromyomateuses, trouble qu'extériorise l'hyperœstrogénémie.

Nous n'avons personnellement effectué qu'un nombre limité de dosages

des œstrogènes urinaires et n'y avons pas relevé d'anomalies notables, l'étude d'un plus grand nombre de cas est actuellement en cours.

La présence fréquente chez ces malades de kystes folliculaires, dont nous verrons ultérieurement la grande richesse en œstrogènes (surtout en œstradiol), peut être également un des facteurs responsables de l'hyperœstrogénémie que nous avons constatée, et a incité Granjon et Yannotti à préconiser l'association à la myomectomie ou à l'hystérectomie d'une résection ovariennne dans le but de freiner la production œstrogénique.

Récemment Luisi et collaborateurs (1963) ont constaté par dosage semi-quantitatif après chromatographie sur papier ou en couche mince l'existence d'œstrogènes et surtout d'œstradiol-17 $\beta$  en quantités plus importantes dans les ovaires des femmes porteuses de fibromes utérins.

### Conclusion

Le dosage des œstrogènes sanguins, en dépit de la délicatesse de son exécution qui en limite l'utilisation à quelques laboratoires spécialisés, nous semble un examen d'avenir.

La brève revue bibliographique et les quelques résultats personnels que nous venons de présenter montrent qu'il a déjà pu fournir des résultats intéressants sur le métabolisme des œstrogènes dans l'espèce humaine.

La faible augmentation observée au cours de la grossesse normale et les écarts individuels importants en limitent cependant la portée actuelle à une simple recherche physiologique, l'examen des œstrogènes urinaires restant préférable en clinique. Il n'est pas impossible cependant que l'on décèle des anomalies des œstrogènes sanguins dans les grossesses pathologiques.

Dès maintenant il faut signaler que Roy, Harkness et Korr (1963) ont étudié le taux des œstrogènes sanguins chez des femmes prééclamptiques. Ils ont constaté dans près de la moitié des cas une baisse des œstrogènes sanguins parallèle à celle des œstrogènes urinaires et ils ont pu calculer un coefficient de corrélation entre l'œstriol urinaire exprimé en ml par 24 heures et l'œstriol sanguin exprimé en  $\mu$ g par 100 ml de sang veineux périphérique.

Cependant Schwerts (1964) qui a effectué une étude statistique du taux des œstrogènes au cours de la deuxième moitié de la grossesse en a conclu que les variations individuelles des œstrogènes plasmatiques sont trop considérables pour que ce dosage puisse être utilisé efficacement en clinique.

En dehors de la grossesse, nous avons pu obtenir des résultats intéressants tant dans les stérilités que dans les aménorrhées ou les métrorragies, résultats au moins aussi fructueux que ceux que la mesure des œstrogènes urinaires peut fournir.

La méthode de dosage que nous préconisons présente cependant encore quelques imperfections : faible récupération d'hormone pure, malheureuse-

ment commune — nous l'avons vu — à toutes les techniques de dosage des œstrogènes dans le sang, et léger défaut de spécificité aux faibles valeurs.

Nous nous proposons actuellement d'atténuer ce défaut en réextrayant la fluorescence par le tétrabromure d'acétylène (Ittrich, 1958; Roy, 1962 b) et nous obtiendrons peut-être ainsi des résultats légèrement différents des précédents.

### III. — DOSAGE DES ŒSTROGÈNES DANS DES LIQUIDES ORGANIQUES PRÉLEVÉ AU COURS D'INTERVENTIONS CHIRURGICALES

#### *Dosage dans le sang de la veine ovarienne*

La sécrétion d'œstradiol-17 $\beta$  et d'œstrone par l'ovaire étant difficile à mettre en évidence dans le tissu puisqu'il a fallu à Mac Corquodale, Thayer et Doisy, en 1935, 4 tonnes d'ovaire de truie pour isoler 11 milligrammes d'œstradiol, nous avons pensé qu'il serait peut-être plus facile de l'objectiver dans le sang des vaisseaux efférents.

Nous avons donc, au cours de trois années, effectué le dosage simultané des œstrogènes sanguins dans le sang veineux périphérique et le sang veineux ovarien prélevés lors d'interventions chirurgicales sur le petit bassin.

En dépit des difficultés techniques que comporte le cathétérisme de la veine ovarienne, et grâce à la précieuse collaboration de tout le personnel chirurgical de la Maternité de Port-Royal, nous avons pu étudier ainsi 25 malades.

Douze des femmes opérées ne présentaient aucun trouble endocrinien, l'intervention chirurgicale étant effectuée pour des raisons diverses (kystes de l'ovaire, stérilité tubaire, fibromes, troubles de la statique utérine). Six femmes étaient enceintes; chez 4 d'entre elles, les prélèvements ont été effectués au cours d'avortements thérapeutiques. Sept malades enfin présentaient de l'hirsutisme ou des troubles des règles pour lesquels une résection cunéiforme des ovaires fut effectuée.

Afin de considérer des cas plus homogènes, nous avons jugé préférable d'étudier séparément ces trois catégories de malades (tableau XIII) et nous avons ensuite rassemblé les résultats finals pour en faire l'étude statistique (tableau XIV).

1° Chez les douze femmes sans troubles endocriniens que nous avons étudiées, la concentration en œstrone, faible dans le sang veineux périphé-

TABLEAU XIII. — DOSAGES COMPARATIFS DES ŒSTROGÈNES DANS LE SANG VEINEUX PÉRIPHÉRIQUE ET LE SANG DE LA VEINE OVARIENNE.

(Résultats exprimés en  $\mu\text{g}/100\text{ ml}$  de sang.)

|                                                             | Sang veineux périphérique |                       |                       | Sang veineux ovarien |               |                       |
|-------------------------------------------------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|---------------|-----------------------|
|                                                             | Œstrone                   | Œstradiol             | Œstriol               | Œstrone              | Œstradiol     | Œstriol               |
| I. - Troubles gynécologiques non endocriniens (12 cas) .... | 3 nuls                    | 7 nuls                | 8 nuls                | Tous positifs        | Tous positifs | 9 nuls                |
| Moyenne $\pm$ déviation standard .....                      | $0,7 \pm 0,6$             | $0,2 \pm 0,1$         | $1,3 \pm 0,6$         | $1,7 \pm 1,1$        | $2,0 \pm 1,7$ | $1,4 \pm 0,8$         |
| II. - Hirsutisme, troubles des règles (7 cas) ....          | 3 nuls                    | 3 nuls                | 4 nuls                | 1 nul                | 1 nul         | 6 nuls                |
| Moyenne $\pm$ déviation standard .....                      | $0,3 \pm 0,2$             | $\pm$ nul             | $0,7 \pm 0,3$         | $4,2 \pm 3,1$        | $4,7 \pm 3,6$ | $0,5 \pm 0,3$         |
| III. - Femmes enceintes (6 cas) ....                        | Tous positifs             | Tous positifs, sauf 1 | Tous positifs, sauf 1 | Tous positifs        | Tous positifs | Tous positifs, sauf 1 |
| Moyenne $\pm$ déviation stan-                               | $2,8 \pm 2,0$             | $0,5 \pm 0,4$         | $1,3 \pm 0,8$         | $3,8 \pm 2,0$        | $1,7 \pm 1,2$ | $3,6 \pm 2,9$         |

rique (valeur moyenne  $0,7 \pm 0,6 \mu\text{g}/100\text{ ml}$ ), est toujours supérieure dans le sang veineux ovarien où la concentration moyenne atteint  $1,7 \pm 1,1 \mu\text{g}/100\text{ ml}$ . La différence est d'ailleurs statistiquement significative.

$t$  = variable réduite de Student = 9 avec

$P$  = probabilité de l'hypothèse hasard  $< 0,001$ .

De même la concentration de l'œstradiol pratiquement nulle dans le sang veineux périphérique atteint  $2,0 \pm 1,77 \mu\text{g}/100\text{ ml}$  dans le sang de la veine ovarienne, où l'œstradiol est toujours décelé alors qu'il est indosable dans 8 cas sur 12 dans le sang veineux périphérique. Ici aussi la différence est statistiquement significative ( $t = 8,6$ ;  $P < 0,001$ ).

L'œstriol par contre n'est présent dans le sang de la veine ovarienne que lorsqu'il existe également dans le sang veineux périphérique et les

TABLEAU XIV. — COMPARAISON ENTRE SANG VEINEUX PÉRIPHÉRIQUE  
ET SANG VEINEUX OVARIEN.

ETUDE STATISTIQUE DES RÉSULTATS OBTENUS CHEZ 25 FEMMES.

Exprimés en  $\mu\text{g}$  par 100 ml de sang.

|              | SANG VEINEUX<br>PÉRIPHÉRIQUE<br>Moyenne $\pm$ écart-<br>type de la moyenne | SANG VEINEUX<br>OVARIEN<br>Moyenne $\pm$ écart-<br>type de la moyenne | t (variable<br>réduite<br>de Student) | P (proba-<br>bilité de<br>l'hypothèse<br>hasard) |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Œstrone ...  | 1,2 $\pm$ 0,3<br>La différence est très significative.                     | 2,8 $\pm$ 0,5                                                         | t = 2,5                               | P = 0,01                                         |
| Œstradiol .. | 0,2 $\pm$ 0,1<br>La différence est significative.                          | 2,6 $\pm$ 0,6                                                         | t = 3,4                               | P < 0,01                                         |
| Œstriol .... | 1,2 $\pm$ 0,3<br>La différence N'EST PAS significative.                    | 1,6 $\pm$ 0,5                                                         | t = 0,76                              | P > 0,1                                          |

valeurs moyennes sont pratiquement identiques (1,3  $\pm$  0,6 et 1,4  $\pm$  0,8  $\mu\text{g}$ /100 ml).

2° Nous avons également eu la possibilité d'examiner le sang de **7 femmes hirsutes ou aménorrhéiques**, présentant pour la plupart un syndrome de Stein et Leventhal.

L'œstrone et l'œstradiol sont pratiquement absents du sang veineux périphérique de ces malades qui présentaient, nous l'avons dit, des troubles endocriniens importants ayant nécessité le recours à la résection cunéiforme des ovaires.

Par contre, dans le sang veineux ovarien, il existe des quantités importantes d'œstrone et d'œstradiol-17 $\beta$  (valeurs moyennes respectives : 4,2  $\pm$  3,1 et 4,7  $\pm$  3,6  $\mu\text{g}$ /100 ml), ces deux hormones sont retrouvées en quantité mesurable dans tous les cas, sauf 1, indiquant bien l'existence d'un phénomène sécrétoire en amont. Là non plus l'œstriol n'est pas plus abondant dans le sang veineux ovarien que dans le sang veineux périphérique (valeur moyenne 0,7 dans le sang veineux périphérique et 0,5 dans le sang veineux ovarien), et n'est jamais retrouvé dans la veine ovarienne quand il est indosable dans le sang circulant.

3° Nous avons enfin étudié **6 femmes enceintes** dont 4 lors d'avortements thérapeutiques, les 2 autres au cours de césariennes à terme.

La concentration d'œstrone est plus élevée dans le sang veineux ovarien dans tous les cas, sauf 1 (valeur moyenne 2,8  $\pm$  2,0  $\mu\text{g}$ /100 ml dans le sang veineux périphérique; 3,8  $\pm$  2,0 dans le sang veineux ovarien).

La concentration en œstradiol est également plus élevée dans tous les

cas dans le sang veineux ovarien (valeurs moyennes respectives :  $0,5 \pm 0,4$  et  $1,7 \pm 1,2$   $\mu\text{g}/100$  ml).

Pour cette substance, malgré le petit nombre de cas étudiés, la différence entre les concentrations moyennes dans les deux milieux est d'ailleurs statistiquement significative ( $t =$  variable réduite de Student = 7 et  $P < 0,001$ ).

Contrairement aux cas précédents, dans les grossesses en évolution, la concentration en œstriol est plus élevée dans le sang veineux ovarien ( $3,6 \pm 2,9$   $\mu\text{g}/100$  ml) que dans le sang veineux périphérique ( $1,3 \pm 2,9$ ).

Nous ne pouvons dire si ceci est dû à l'existence d'un corps jaune ou au fait que les veines ovariennes que nous cathétérisons drainent une partie des cornes utérines.

4° **L'étude statistique des résultats obtenus chez 25 femmes** montre l'existence d'une différence significative entre les concentrations d'œstrone et d'œstradiol étudiées simultanément dans le sang veineux périphérique et le sang de la veine ovarienne, alors que la différence n'est pas significative pour l'œstriol (tableau XIV).

*Dans le sang veineux ovarien, la concentration en œstradiol-17 $\beta$  est plus de 10 fois supérieure à celle observée dans le sang veineux périphérique prélevé simultanément.*

La prédominance nette de l'œstradiol sur l'œstrone dans le sang veineux ovarien, alors que dans le sang veineux périphérique il est pratiquement indosable en dehors de la grossesse, et reste très inférieur aux deux autres œstrogènes au cours de celle-ci, semble très caractéristique de la sécrétion ovarienne.

Nous verrons en effet dans le prochain paragraphe que dans les kystes folliculaires une semblable prééminence est retrouvée.

5° **Données de la littérature.** — Hardy et collaborateurs (1957) ont étudié également les œstrogènes dans le sang veineux ovarien. Ces auteurs ont trouvé par la méthode de Brown, chez 3 femmes de moins de 40 ans, une concentration moyenne de 9,1  $\mu\text{g}/100$  ml de plasma (de 3,3 à 14,1). Dans un autre groupe de femmes âgées de plus de 40 ans (âge moyen : 57 ans), la concentration moyenne des œstrogènes dans le plasma veineux ovarien était seulement de 2,8  $\mu\text{g}/100$  ml, variant entre 1,2 et 6,8  $\mu\text{g}$ . Comme nous, ces auteurs ont observé que la concentration dans le sang périphérique était dans tous les cas observés, inférieure à 2  $\mu\text{g}$  par 100 ml, donc plus faible que dans le sang ovarien.

Plus récemment Mahesh et Greenblatt (1962) ont trouvé par la méthode de Preedy et Aitken dans le sang veineux ovarien d'une femme normale de l'œstradiol en quantité égale à 1,7  $\mu\text{g}/100$  ml au voisinage de l'ovulation sans pouvoir y déceler de l'œstrone, ni de l'œstriol.

Le sang veineux efférent d'ovaires polykystiques était moins riche avec un rapport œstradiol/androgènes beaucoup plus faible que chez les femmes

normales et au contraire de celles-ci, l'administration de FSH pituitaire humaine n'augmentait pas ce rapport, confirmant ainsi l'existence de troubles enzymatiques dans les ovaires polykystiques.

### ***Dosage des œstrogènes dans le liquide de kystes folliculaires***

Il n'est pas dans notre propos d'étudier ici le rôle respectif des divers éléments constitutifs de l'ovaire dans la biosynthèse des œstrogènes qui a fait l'objet de nombreuses controverses. Il semble bien à l'heure actuelle que, en plus des cellules de la thèque interne, les cellules de la granulosa et les cellules interstitielles ont une activité sécrétoire importante.

La sécrétion des œstrogènes par les cellules de la thèque interne a été démontrée dès 1926 par les travaux de Parkes d'une part, après irradiation sélective aux rayons X de la granulosa et de l'ovocyte, et par ceux de Zondek et d'Ascheim (1927) d'autre part, qui constatèrent que le cortex ovarien et la granulosa seuls sont inactifs alors que les follicules atresiques et les parois des follicules mûrissants possèdent une activité œstrogénique.

Mac Corquodale, Thayer et Doisy (1936) ont isolé l'œstradiol des ovaires de truie et, en 1938, ces auteurs, en collaboration avec Westerfield, ont également identifié de l'œstrone dans le même matériel.

On a admis depuis lors que ces deux hormones sont formées et sécrétées par les ovaires des autres espèces, y compris l'homme, alors que l'œstriol et les autres hormones isolées dans les urines sont leurs métabolites.

Jusqu'à ces dernières années, il a été effectué peu de mesures directes dans le liquide folliculaire des ovaires humains, et elles n'ont consisté qu'en des mesures globales de l'activité œstrogénique par des tests biologiques : Franck (1929), Allen, Pratt, Doisy (1925), Zondek et Ascheim (1927), Gillman et Smith (1936), Gluckman (1941), ainsi que Mulhock (1940) constatèrent dans le liquide folliculaire une concentration en œstrogènes assez forte, de 1 à 90 unités Rat, soit 0,45 à 45  $\mu\text{g}$  en équivalent d'œstrone par ml de liquide.

Smith et Smith (1952) purent par chromatographie sur papier attribuer cette activité à de l'œstrone et surtout à de l'œstradiol qu'ils considéraient comme la seule hormone ovarienne.

**1° Travaux personnels.** Tel était l'état de nos connaissances quand le professeur agrégé Granjon nous a demandé en 1957 d'effectuer le dosage des trois fractions œstrogéniques dans le liquide prélevé par aspiration à la seringue des kystes folliculaires découverts lors d'interventions chirurgicales chez des femmes atteintes d'affections gynécologiques diverses.

Il fut admis que ces kystes folliculaires, histologiquement identiques à des follicules de de Graaf distendus, devaient contenir les mêmes œstrogènes

que les follicules normaux. Les interventions chirurgicales ayant été effectuées le plus souvent en phase folliculaire, nous avons pensé que la présence d'œstrogènes dans le liquide de ces kystes et leur concentration devaient correspondre à la sécrétion ovarienne de la phase prolifératrice du cycle menstruel.

a) **Vérifications techniques.** — La méthode de dosage employée est identique à celle utilisée pour la mesure des œstrogènes sanguins. Cette méthode

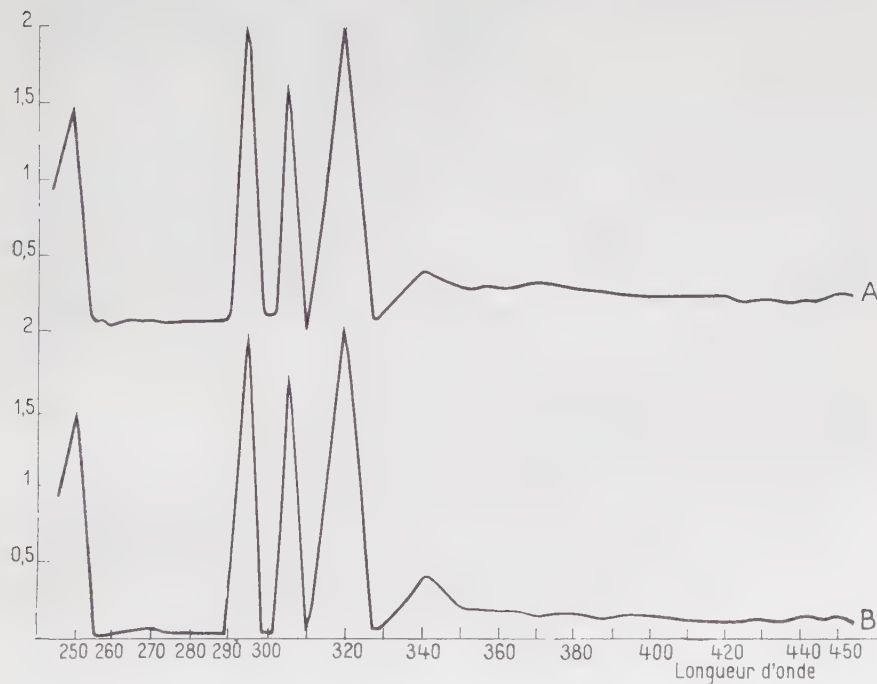


FIG. 16. — Spectre d'absorption en lumière ultraviolette.

A, extrait d'un pool de liquide de kyste folliculaire (15,75 ml) correspondant à  $2\text{ }\mu\text{g}$  d'œstradiol dans 0,4 ml de  $\text{SO}_4\text{H}_2$ ;

B, HP :  $2\text{ }\mu\text{g}$  d'œstradiol dans 0,4 ml  $\text{SO}_4\text{H}_2$ .

ayant été déjà soumise au contrôle des critères habituels : précision, sensibilité, exactitude, spécificité, nous avons plus particulièrement porté nos efforts sur la vérification de la *spécificité de la technique* dans son application au liquide des kystes folliculaires et nous avons recueilli à ce sujet des éléments assez convaincants :

Les spectres de fluorescence mesurés au spectrofluorimètre Farrand présentent des maxima d'excitation et d'émission identiques à ceux des hormones pures.

TABLEAU XV. — DOSAGE DES ŒSTROGÈNES DANS LE LIQUIDE DES KYSTES FOLLICULAIRES. (Valeurs moyennes  $\pm$  déviations standards exprimées en  $\mu\text{g}$  par 100 ml de liquide.)

| Port-Royal                                                                      |                | Œstrone                                                     | Œstradiol                                                     | Œstriol                                      |
|---------------------------------------------------------------------------------|----------------|-------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| 71 dosages effectués de 1957 à 1962 en phase folliculaire pour la plupart ..... |                | 51 dosages positifs                                         | 68 dosages positifs                                           | 36 dosages                                   |
|                                                                                 |                | 10 dosages nuls<br>(0 à 32 $\mu\text{g}$ )<br>$7,2 \pm 7,4$ | 3 dosages nuls<br>(0 à 110 $\mu\text{g}$ )<br>$22,4 \pm 21,4$ | 35 dosages nuls<br>$2,6 \pm 5,3$<br>positifs |
| 44 kystes de volume supérieur à 5 ml .....                                      |                | $10,2 \pm 7,8$                                              | $28,4 \pm 27,0$                                               | 3,3<br>(26 dosages nuls)                     |
| 27 kystes de volume supérieur à 5 ml .....                                      |                | $2,9 \pm 2,8$                                               | $12,6 \pm 21,2$                                               | 1,7<br>(9 dosages nuls)                      |
| Autres auteurs                                                                  | Phase du cycle | Œstrone                                                     | Œstradiol                                                     | Œstriol                                      |
| Smith (1960) .....                                                              | Folliculaire   | 6,4                                                         | 32,5                                                          | $< 0,5$                                      |
|                                                                                 | Lutéale        | 14,6                                                        | 10,4                                                          | 24,0                                         |

Les extraits œstrogéniques après chromatographie contiennent des substances qui réagissent avec les *réactifs de Brown*. Les réactions colorées présentent pour les fractions œstrone et œstradiol des maxima aux mêmes longueurs d'onde que les hormones pures correspondantes et les mesures quantitatives obtenues par les deux méthodes (colorimétrique et fluorimétrique) sont du même ordre de grandeur.

Enfin, nous avons étudié le *spectre d'absorption en lumière ultraviolette* (Unicam S.P. 500) de la fraction œstradiol obtenue, après traitement d'un mélange de 15,75 ml de liquide correspondant à 10 kystes folliculaires, maintenue deux heures à l'obscurité en solution dans 0,4 ml d'acide sulfurique (micro-méthode de la technique de Burnstein et Leenhardt). Nous avons pu constater que la courbe d'absorption était absolument superposable à celle de la quantité correspondante d'hormone pure (fig. 16). Les faibles quantités en présence nous ont empêché d'effectuer ce contrôle pour l'œstrone et l'œstriol et, *a fortiori*, d'étudier le spectre infrarouge.

b) Les résultats obtenus au cours des dosages effectués dans 71 liquides de kystes folliculaires sont résumés dans le tableau XV.

Nous voyons que :

L'œstrone est compris entre 0 et 32  $\mu\text{g}$  pour 100 ml de liquide, la valeur moyenne étant de  $7,2 \pm 7,4$   $\mu\text{g}$  pour 100 ml.

L'œstradiol est présent en quantité beaucoup plus considérable. Alors que l'œstrone de toute façon peu abondant n'a pu être décelé dans 10 kystes, l'œstradiol a toujours pu être dosé, sauf dans 3 cas, et à des taux élevés allant jusqu'à 110  $\mu\text{g}$  par 100 ml.

L'œstradiol est dans 55 cas sur 71 supérieur à l'œstrone.

*La valeur moyenne de l'œstradiol est de  $22,4 \pm 21,4$   $\mu\text{g}$  par 100 ml, soit trois fois plus élevée que celle de l'œstrone.*

Par contre, la fraction correspondant à l'œstriol est très pauvre. En effet, sur les 69 dosages effectués, 34 sont nuls. La valeur moyenne est évidemment très faible :  $2,6 \pm 5,3$   $\mu\text{g}/100$  ml. On voit que la dispersion des résultats est assez considérable. Ceci est probablement dû au fait que la concentration semble inversement proportionnelle à la quantité de liquide. En effet, on peut voir dans le tableau XV que les concentrations moyennes respectives des trois fractions œstrogéniques sont beaucoup plus élevées dans les 44 kystes de volume inférieur à 8 ml que dans les 27 kystes de volume supérieur à 5 ml.

*En résumé, les kystes folliculaires contiennent le plus souvent de l'œstrone et pratiquement toujours de l'œstradiol-17 $\beta$ . Cette hormone atteint des concentrations parfois considérables (110  $\mu\text{g}/100$  ml) et sa valeur moyenne dans les 44 kystes de volume inférieur à 5 ml est de 28,4  $\mu\text{g}/100$  ml.*

*Par contre, l'œstriol est le plus souvent absent ou présent en faibles quantités seulement.*

**2° Données de la littérature.** — Ces résultats confirment l'opinion émise par la plupart des auteurs selon laquelle l'œstriol n'est pas une hormone ovarienne primitive (tout au moins si l'on excepte le corps jaune). Sa présence certaine cependant dans quelques kystes peut s'expliquer par la coexistence de progestérone que les travaux de Short (1960-1962) et tout récemment de M<sup>me</sup> Giorgi (1963) ont démontré. Il est actuellement possible de comparer ces résultats avec ceux de quelques auteurs.

Des recherches communes réalisées dans les laboratoires de Cologne et de Stockholm ont permis à Zander et à Diezfalusy (1959) de constater dans le liquide folliculaire humain la présence d'œstradiol-17 $\beta$  et d'œstrone alors qu'ils ne trouvaient que peu ou pas d'œstriol.

Ces substances étaient essentiellement sous forme libre, ce qui est en faveur d'une production directe par l'ovaire humain.

O.W. Smith (1960) a également recueilli le liquide folliculaire chez des femmes en période d'activité génitale et les a séparées en deux lots d'après les dates de menstruation et les biopsies de l'endomètre.

Un lot représentait la phase de sécrétion préovulatoire, le deuxième lot la phase sécrétoire.

Un extrait de chacun de ces lots, après addition d'œstrogènes marqués au carbone 14, fut purifié par chromatographie sur colonne puis sur papier, méthylation et chromatographie des méthyl-éthers.

La fluorescence et la radio-activité furent mesurées à chaque stade. L'œstradiol-17 $\beta$  et l'œstrone furent identifiés dans les deux lots, l'œstriol ne fut identifié par contre que dans le liquide recueilli en phase lutéale. On peut constater dans le tableau XV que les résultats de O. Smith en phase de prolifération sont extrêmement voisins des nôtres.

O. Smith (communication personnelle) a ultérieurement reconnu que seuls les liquides recueillis en phase de prolifération correspondaient à des kystes folliculaires, le second lot correspondant probablement à des kystes lutéiniques.

Short enfin qui étudie depuis 1960 les stéroïdes présents dans le liquide folliculaire de divers animaux, en particulier celui de la jument et de la vache, a constaté par chromatographie sur papier la présence constante d'œstrone et surtout d'œstradiol-17 $\beta$  dans les folliculaires bovins et équins.

Plus récemment, il a étendu ses recherches à l'espèce humaine (Short et London, 1961; Short, 1962) et a trouvé ainsi que M<sup>me</sup> Giorgi (1963) des anomalies spécifiques dans les ovaires du syndrome de Stein-Leventhal consistant en un déficit en œstrogènes, associé à un taux élevé de  $\Delta$  4-androstène-dione, et suggérant d'un blocage de la transformation des androgènes en œstrogènes.

3° M<sup>me</sup> Ricard, dans sa thèse de médecine (1962), a tenté de *replacer quelques-uns de nos résultats dans leur cadre clinique* :

— 18 cas, soit 20 kystes, correspondent à des fibromyomes,

— 11 cas, soit 11 kystes, ont été observés lors de cures de rétro-déviation utérines.

Dans ces deux groupes de malades, les kystes folliculaires contenaient une grande quantité d'œstrogènes.

Dans les rétro-déviation utérines, les concentrations moyennes étaient  $9,2 \pm 9,1$   $\mu\text{g}/100$  ml pour l'œstrone,  $27,1 \pm 26,1$  pour l'œstradiol,  $2,4 \pm 2,1$  pour l'œstriol. Dans 8 cas, l'œstradiol était supérieur à l'œstrone et dans 4 cas l'œstriol nul.

Chez les 18 malades porteuses de fibromyomes utérins, la valeur moyenne de l'œstrone était de  $6,3 \pm 6,5$   $\mu\text{g}/100$  ml, de  $14,1 \pm 14,5$   $\mu\text{g}$  pour l'œstradiol et de  $3,7 \pm 5,3$  pour l'œstriol.

L'existence de ces kystes folliculaires et leur grande richesse en œstrogènes peuvent correspondre à une sécrétion anormale responsable de l'hyper-œstrogénémie que nous avons par ailleurs constatée au cours de la maladie fibromyomateuse (Granjon et collaborateurs, 1962).

Par contre, 2 cas de syndrome de Stein-Leventhal ont été étudiés :

— chez l'une de ces malades, aucun œstrogène n'a pu être décelé dans le liquide kystique prélevé;

— chez l'autre malade, l'œstradiol (10,3  $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ ) était à peine supérieur à l'œstriol (9,1  $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ ), fait très inhabituel.

Nous avons vu plus haut que Short et collaborateurs (1961) et M<sup>me</sup> Giorgi (1963) n'ont pratiquement jamais pu doser d'œstrogènes dans le liquide kystique des ovaires de Stein-Leventhal, alors qu'ils y constataient de grandes quantités d'androgènes.

### Résumé

*En résumé, les mesures que nous avons effectuées dans le liquide des kystes folliculaires aussi bien que les dosages des œstrogènes dans le sang veineux ovarien nous ont montré une prédominance de l'œstradiol très caractéristique de la sécrétion ovarienne.*

En effet, dans le sang veineux ovarien, la concentration moyenne de l'œstradiol-17 $\beta$  est dix fois plus élevée et celle de l'œstriol presque identique à celle du sang veineux périphérique.

De même, dans le liquide des kystes folliculaire, l'œstradiol atteint des taux parfois considérables (110  $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ ) et sa valeur moyenne (22,4  $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ ) est trois fois plus élevée que celle de l'œstrone (7,2  $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ ). La fraction correspondant à l'œstriol par contre est très pauvre et, sur les 69 dosages effectués, 34 furent nuls.

Ces résultats confirment l'opinion émise par la plupart des auteurs que, si l'on excepte le corps jaune, l'œstradiol-17 $\beta$  est l'hormone ovarienne prépondérante.

## IV. — DOSAGE DES ŒSTROGÈNES SANGUINS AU COURS DE QUELQUES RECHERCHES EXPÉRIMENTALES

Nous avons également tenté, par le dosage des œstrogènes sanguins, d'étudier les facteurs favorisant la transformation de l'œstrone en œstriol, et plus particulièrement le rôle de la progestérone et de la muqueuse utérine dans le métabolisme des œstrogènes *in vivo*.

Certains travaux sont malheureusement assez anciens (1957) et effectués à une époque où nous ne purifions pas nos extraits par saponification et

chromatographie sur colonne de célite. L'œstrone et l'œstradiol n'étaient donc pas séparés et étaient dosés globalement avec nombre d'impuretés.

La fraction correspondant à l'œstriol, par contre, était moins entachée d'erreurs, comme en témoignait le fait qu'elle était constamment nulle chez les sujets normaux en l'absence de corps jaune.

### *Influence de la progestérone sur le métabolisme des œstrogènes*

Au cours d'une première série d'études effectuées en 1956-1957, nous avons étudié le taux des deux fractions œstrone-œstradiol et œstriol du sang veineux périphérique au cours du cycle menstruel chez 19 femmes normales, et constaté *l'absence d'œstriol en phase folliculaire et sa présence quasi constante en phase lutéale* (ainsi qu'au cours de la grossesse), ce qui nous a amenée à étudier l'influence de la progestérone sur le métabolisme des œstrogènes d'origine exogène.

**1° Données de la littérature.** — Le rôle de la progestérone dans le métabolisme des œstrogènes a été envisagé depuis plusieurs années, mais sa nature est très controversée.

En effet, Pincus et Zahl, en 1937, ont trouvé que chez la lapine la progestérone augmentait la quantité d'œstrogènes excrétée, et que son administration ou la sécrétion d'un corps jaune actif facilitait la conversion de l'œstrone en œstriol.

Smith et Smith (1938), se basant sur ces faits, pensaient que la progestérone retardait la destruction des œstrogènes et favorisait la conversion de l'œstrone et de l'œstradiol en œstriol. Ils faisaient de la distribution des divers œstrogènes dans l'urine un index de l'activité progestéronique. Cette notion s'est d'ailleurs maintenue puisque Brown et Matthew (1962) ont étudié en phase lutéale aussi bien la valeur globale des œstrogènes que le rapport entre l'œstriol et les deux autres œstrogènes.

Expérimentalement, l'influence de la progestérone et les modalités de son activité se sont cependant révélées indémontrables.

En effet, Segaloff (1947) pensait que la progestérone agissait comme protecteur des œstrogènes en diminuant l'inactivation hépatique de l'œstradiol. Or, Heller et Heller (1943) avaient constaté que le foie des femelles gestantes inactive les œstrogènes *in vivo* de la même manière que les autres foies. Chez le lapin, Heard (1941) n'avait pas observé non plus d'influence de la progestérone sur le métabolisme des œstrogènes après injection simultanée des deux hormones.

Chez la femme, enfin, Stimmel et collaborateurs (1952) n'ont pas vu de différence entre les pourcentages d'excrétion des œstrogènes urinaires exogènes dans les phases pré et post-ovulatoires du cycle menstruel et en ont

TABLEAU XVI. — MODIFICATIONS DES ŒSTROGÈNES SANGUINS  
APRÈS ADMINISTRATION INTRAMUSCULAIRE DE BENZOATE D'ŒSTRADIOL  
OU DE PROGESTÉRONNE.

|                                         | <i>Injection<br/>intramusculaire<br/>de benzoate<br/>d'œstradiol</i>                                                                | <i>Injection<br/>intramusculaire<br/>de progestérone</i>                                                      | <i>Injection<br/>intramusculaire<br/>de progestérone +<br/>benzoate<br/>d'œstradiol</i>                                                                                           |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Femmes normales ou<br>ménopausées ..... | (5 expériences<br>avec 50 mg)<br>Augmentation de la<br>fraction œstrone-<br>œstradiol.<br>Apparition d'œs-<br>triol.                | (2 expériences<br>avec 50 mg)<br>Fraction œstrone-<br>œstradiol inchan-<br>gée.<br>Apparition d'œs-<br>triol. |                                                                                                                                                                                   |
| Femmes hystérecto-<br>misées .....      | (5 expériences<br>avec 50 mg)<br>Elévation de la<br>fraction œstrone-<br>œstradiol.<br>Pas d'œstriol.                               | (2 expériences<br>avec 20 mg)<br>Fraction œstrone-<br>œstradiol inchan-<br>gée.<br>Apparition d'œs-<br>triol. | (3 expériences avec<br>20 mg de proges-<br>térone + 50 mg<br>de benzoate d'œs-<br>tradiol.<br>Augmentation de la<br>fraction œstrone-<br>œstradiol.<br>Apparition d'œs-<br>triol. |
| Hommes .....                            | (5 expériences avec<br>25 mg de benzo-<br>ate d'œstradiol.)<br>Elévation de la<br>fraction œstrone-<br>œstradiol.<br>Pas d'œstriol. | (2 expériences<br>avec 50 mg)<br>Fraction œstrone-<br>œstradiol inchan-<br>gée.<br>Apparition d'œs-<br>triol. | 25 mg benzoate<br>d'œstradiol + 20 mg<br>progestérone<br>(2 expériences)<br>Augmentation de la<br>fraction œstrone-<br>œstradiol.<br>Apparition d'œs-<br>triol.                   |

conclu que l'état physiologique (prolifératif ou progestatif) de l'endomètre de la femme n'a pas d'influence sur le caractère des œstrogènes urinaires.

De même Pearlman et collaborateurs (1954), après administration d'acétate de 6-7-deutéro-œstrone à une femme enceinte, n'obtinrent qu'une récupération d'œstrogènes basse et en tout point comparable à celle qu'ils avaient obtenue auparavant chez l'homme (1953) malgré la sécrétion abondante de progestérone caractéristique de la grossesse. C'est d'ailleurs cette discordance entre la fixité de la distribution des œstrogènes urinaires après

administration exogène et l'importance de l'élimination urinaire de l'œstriol au cours de la grossesse qui a mis de nombreux auteurs, en particulier J.B. Brown, sur la voie d'une synthèse directe de l'œstriol (Fishman, Brown et collaborateurs, 1962), hypothèse d'ailleurs actuellement confirmée au niveau du placenta, comme nous le verrons dans un prochain chapitre.

Les contradictions que nous venons de citer sur le rôle de la progestérone dans le métabolisme des œstrogènes sont assez surprenantes et ont amené Pincus (1954) à se demander « si l'homme est à cet égard différent des animaux de laboratoire utilisés jusqu'ici ou si l'expérience cruciale n'a pas été encore réalisée avec lui ».

Nous pensons pour notre part que toutes les expériences précitées se sont limitées aux dosages des métabolites urinaires qui ne reflètent qu'indirectement le métabolisme intermédiaire et l'utilisation des stéroïdes et que l'étude des œstrogènes sanguins peut être plus intéressante.

**2° Résultats personnels.** — L'examen du tableau XVI montre que *l'administration intramusculaire de 50 mg de progestérone cristallisée en solution huileuse (lutogyl) à des femmes ménopausées ou castrées, ou à des hommes, fait apparaître de l'œstriol dans leur sang veineux périphérique en quantités dosables* dans tous les cas 6 heures après l'injection, alors qu'il était nul au début de l'expérience.

De même l'administration intramusculaire simultanée de 50 mg de benzoate d'œstradiol en solution huileuse (benzo-gynœstryl) et de 20 mg de progestérone (lutogyl) chez 3 femmes ayant subi une hystérectomie totale avec ablation des annexes et chez 2 hommes normaux a entraîné, outre une élévation notable de la fraction œstrone-œstradiol, l'apparition d'œstriol dans le sang circulant, alors que cette hormone restait strictement indosable chez ces mêmes sujets après administration de benzoate d'œstradiol seul.

*Ces expériences nous ont donc permis de penser que la progestérone est capable de favoriser la transformation de l'œstradiol en œstriol, même en l'absence d'utérus fonctionnel.* Nul ne sait où se produit cette transformation; peut-être a-t-elle lieu en plusieurs points de l'organisme. On sait en effet que la progestérone se répartit très rapidement dans les différents tissus graisseux, physiologiquement chez la femme enceinte ou en phase lutéale (Kaufmann et Zander, 1956), aussi bien qu'après injection, comme on a pu le vérifier avec de la progestérone marquée par du C<sup>14</sup> (Plotz et Davis, 1957).

### *Rôle de l'utérus et plus précisément de l'endomètre dans le métabolisme des œstrogènes*

Nous avons également tenté d'éclaircir le rôle de l'utérus et plus spécialement de sa muqueuse dans le métabolisme des œstrogènes *in vivo*.

**1° Données de la littérature.** — Une telle influence, nous l'avons vu, a déjà été soupçonnée par Pincus et Zahl (1937) qui concluaient de travaux effectués chez le lapin que l'œstrone administrée était convertie en œstriol chez l'animal possédant un utérus fonctionnel. Cette théorie a été reprise par Smith et Smith (1938) qui faisaient jouer à la progestérone un rôle important dans ces transformations.

Ultérieurement, cependant, Pearlman et collaborateurs ont constaté que l'œstriol peut être isolé de l'urine en quantités égales chez l'homme aussi bien que chez la femme (1953).

Plus récemment Ullberg et Bengtsson (1963), étudiant la distribution des œstrogènes naturels, ont constaté par autoradiographie une accumulation sélective de l'œstradiol-3H et du  $^{14}\text{C}$ -œstrone dans les cellules de l'endomètre de la souris, confirmant les résultats antérieurs de de Paepe (1960).

Les troubles de la fonction ovarienne, avec une maturation folliculaire désordonnée, une dégénérescence kystique et finalement une atrophie des ovaires, observés fréquemment aussi bien chez les femmes hystérectomisées que chez l'animal d'expériences, incitent également à attribuer un rôle à l'utérus dans le métabolisme des hormones ovariennes.

Nous avons pensé que la présence ou l'absence d'œstriol dans le sang circulant pouvait être l'indice d'une transformation de l'œstradiol en œstriol normale, ou ralentie par l'absence d'endomètre, et nous avons pu effectuer un certain nombre d'observations et d'expériences qui nous ont confirmée dans cette opinion.

**2° Résultats personnels.** — a) *Nous avons étudié 12 femmes de 33 à 47 ans ayant subi des hystérectomies quelques mois ou quelques années auparavant (le plus souvent subtotales) avec conservation des annexes.*

Nous avons vérifié chez 10 d'entre elles la persistance de l'activité des ovaires restants, par l'existence de petits signes fonctionnels (gonflement périodique des seins), et surtout par la constatation de décalage de la température basale et de signes cytologiques d'ovulation décelés lors de l'examen des cycles de frottis vaginaux.

Nous avons effectué systématiquement chez ces malades deux dosages des œstrogènes sanguins à 15 jours d'intervalle environ. Dix dosages ont ainsi été effectués quelques jours après des ovulations décelées cytologiquement ou lors de plateaux thermiques. *Or, dans aucun cas, nous n'avons pu mettre en évidence la moindre trace d'œstriol dans le sang veineux périphérique, alors que nous en retrouvons de façon quasi constante chez les femmes normales en phase lutéale.*

Par contre, une malade qui n'avait subi qu'une hystérectomie fundique en 1943, et qui avait reconstitué une muqueuse utérine suffisante pour produire des règles régulières, avait présenté à deux reprises de l'œstriol dans le sang circulant, réalisant ainsi une véritable contre-épreuve.

Plus récemment, nous avons étudié 3 malades avec notre technique

actuelle de dosage, et avons complété ces examens par des mesures du prégnandiol et des œstrogènes urinaires. Chez 2 femmes, il existait incontestablement lors de la deuxième série de dosages un corps jaune sécrétoire, comme en témoignait en particulier l'élévation du prégnandiol et des œstrogènes urinaires. L'œstrone et l'œstradiol sanguins s'étaient également modifiés mais, comme chez les 12 femmes précédentes, l'œstriol restait indosable dans le sang veineux périphérique.

b) Nous avons également recherché les modifications entraînées par la présence ou l'absence d'utérus sur le métabolisme des œstrogènes administrés par voie intramusculaire.

a) Dans une première série d'expériences, nous avons administré par voie intramusculaire 50 mg de benzoate d'œstradiol (benzo-gynoestryl) à 5 femmes en phase folliculaire ou ménopausées. Les femmes ainsi choisies avaient peu d'œstrogènes dans le sang en début d'expérience et en particulier un taux d'œstriol nul.

Nous avons pu constater (tableau XVI) une élévation de la fraction œstrone-œstradiol totale et l'apparition d'œstriol dans le sang circulant dès la fin de la première heure et à la sixième heure. Vingt-quatre heures après l'injection, de l'œstriol était habituellement encore retrouvé dans le sang circulant, alors que la fraction phénolique faible était revenue au taux de départ.

Nous avons pu, en particulier, observer ces phénomènes chez une femme de 72 ans ménopausée depuis 25 ans. Nous avons également, dans un syndrome de Turner de sexe génétique mâle où la laparotomie exploratrice avait vérifié l'agénésie ovarienne et la présence d'un utérus minuscule de la taille d'un petit doigt, pu observer, en plus d'une élévation de la fraction œstrone-œstradiol, l'apparition d'œstriol dans le sang circulant dès la fin de la première heure. L'endomètre de cette malade s'est d'ailleurs ultérieurement révélé réceptif, car un implant d'œstrogènes a entraîné chez elle des métrorragies assez importantes.

β) Par contre, chez 5 femmes hystérectomisées depuis quelques jours, l'injection intramusculaire de 50 mg de benzoate d'œstradiol n'a fait apparaître dans aucun des dosages effectués 1 heure, 6 heures, 24 heures après l'injection la moindre trace d'œstriol dans le sang circulant, en dépit d'une élévation de la fraction œstrone-œstradiol.

L'injection de 25 mg de benzoate d'œstradiol à 5 hommes âgés de 27 à 74 ans a donné des résultats identiques.

Il est intéressant de constater qu'en revanche l'élimination urinaire des œstrogènes après administration intramusculaire de 50 mg de benzoate d'œstradiol était semblable chez une femme ménopausée et chez 2 femmes hystérectomisées.

L'augmentation des œstrogènes urinaires, maxima de 24 à 48 heures après l'injection, comportait dans les 3 cas une très forte prédominance

de l'œstriol. Ces résultats sont identiques à ceux de la plupart des auteurs (Schiller et Pincus, 1943) et coïncident avec l'opinion couramment admise que l'élimination urinaire des œstrogènes d'origine exogène n'est pas influencée par l'état physiologique ni par le sexe du sujet.

γ) Le défaut d'apparition de l'œstriol dans le sang circulant chez une malade qui n'avait pas subi d'hystérectomie vraie mais une intervention

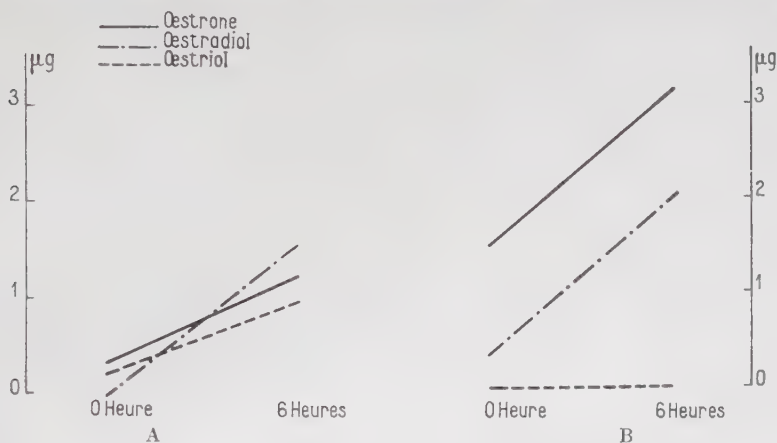


FIG. 17. — Modification des œstrogènes sanguins après administration intramusculaire de 50 mg d'œstradiol 17 $\beta$  en solution huileuse.

Les taux des œstrogènes sanguins sont exprimés en  $\mu\text{g}/100\text{ ml}$  de sang. Après curetage de l'endomètre ou hystérectomie on n'observe pas l'apparition de quantités dosables d'œstriol dans le sang veineux périphérique (B); au contraire de ce que l'on observe chez la femme normale avant toute intervention chirurgicale (A).

de Soresi-Brocq, c'est-à-dire qui conservait une partie de son muscle utérin, ainsi que la notion de la richesse enzymatique très exceptionnelle de l'endomètre, nous ont ultérieurement incitée à *rechercher si la muqueuse utérine n'était pas un lieu de transformation de l'œstradiol en œstriol*.

Nous avons donc repris ultérieurement les expériences précédentes, mais en injectant par voie intramusculaire 50 mg d'œstradiol libre, en solution huileuse, au lieu du benzoate employé précédemment, et en purifiant les extraits selon la méthode que nous utilisons actuellement.

Nous avons pu constater au cours de 4 expériences effectuées quelques heures après un curetage de l'endomètre que seuls l'œstrone et l'œstradiol s'élevaient, alors que l'œstriol restait nul, comme dans un cas après hystérectomie (fig. 17), et que des expériences identiques effectuées avant toute intervention chirurgicale produisaient une élévation des trois fractions œstrogéniques.

### Conclusion et rôle biologique de l'œstriol

L'absence d'œstriol dans le sang circulant chez les femmes hystérectomisées même en cas d'activité fonctionnelle des ovaires restants, le défaut

d'apparition de cette substance dans le sang veineux périphérique après administration intramusculaire d'œstradiol libre ou estérifié chez les femmes hystérectomisées ou ayant simplement subi dans les heures précédentes un curetage de l'endomètre, nous ont permis de penser que la *muqueuse utérine avait un rôle important dans la transformation de l'œstradiol, hormone ovarienne primitive, en œstriol, ou en sa forme circulante.*

*L'action physiologique de l'œstriol est actuellement prouvée.* En effet, contrairement à l'opinion classique qui en faisait un simple métabolite de l'œstrone et de l'œstradiol plus actifs, les travaux de Puck ont démontré que, tant chez la femme que chez l'animal, l'œstriol stimule le col, le vagin et la vulve, alors que l'œstradiol est actif sur le muscle utérin (1957 a).

Borglin (1959), Artner et collaborateurs (1959), ont repris les travaux de Puck et utilisé l'œstriol ou son précurseur immédiat, la 16 $\alpha$ -hydroxy-œstrone (Jayle et Pujol, 1961), dans le traitement des affections locales du col utérin et du vagin.

Après chromatographie sur papier et dosage fluorimétrique, Puck a d'ailleurs montré que le contenu en œstriol du sang des femmes est en corrélation avec l'état du col utérin, et que les femmes dysménorrhéiques avec des cols rigides ont moins d'œstriol dans le sang circulant que celles qui n'ont pas de troubles menstruels (1957 b). Il a également trouvé de l'œstriol ou de l'œstradiol en concentration élevée chez des malades avec hyperplasie glandulo-kystique de l'endomètre et un canal cervical élargi.

C'est au maximum d'œstriolurie que s'ouvre le col et que ses cellules glandulaires sécrètent le mucus vecteur des spermatozoïdes, qui cristallise en feuilles de fougères. C'est à cette phase que s'épaissit l'épithélium vaginal. Abondant lors de la dernière phase de la grossesse, on a rendu l'œstriol responsable (Merrill, 1958) de l'ampliation des voies génitales, et des variations anatomiques électives du col et du vagin opposées à l'immuabilité du corps utérin du nouveau-né dont les tissus riches en œstriol ne contiennent l'œstrone et l'œstradiol-17 $\beta$  qu'à l'état de traces (Diczfalusy et collaborateurs, 1961 b).

## V. — DOSAGE DES ŒSTROGÈNES DANS LES TISSUS HUMAINS

Nous avons ultérieurement recherché si le dosage des œstrogènes dans les tissus humains permettait de vérifier les notions que nous avons présentées. Comme nous l'avons indiqué lors de l'exposé des techniques utilisées, le drainage rapide par les vaisseaux efférents diminue la portée du dosage quantitatif des stéroïdes dans les glandes endocrines. Cependant la compa-

TABLEAU XVII. — DOSAGE DES ŒSTROGÈNES DANS LES OVAIRES.  
Valeurs moyennes  $\pm$  déviations standards exprimées en  $\mu\text{g}/100$  grammes de tissu frais.

|                                                                   | Œstrogènes libres              |                               |                             | Œstrogènes conjugués          |                             |                               | Œstrogènes totaux                | Poids moyen en grammes des ovaires étudiés |
|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------------|
|                                                                   | Œstrone                        | Œstradiol                     | Œstriol                     | Œstrone                       | Œstradiol                   | Œstriol                       |                                  |                                            |
| 18 dosages : valeur moyenne $\pm$ déviation standard . . . .      | $7,1 \pm 4,5$                  | $2,5 \pm 2,2$                 | $2,5 \pm 2,5$               | $3,9 \pm 2,7$                 | $0,7 \pm 0,7$               | $1,0 \pm 1,0$                 | $17,7 \pm 8,5$                   | 5                                          |
| Femmes jeunes porteuses de fibromes ou polypes utérins (10 cas) . | $6,5$<br>$1,8 \text{ à } 15,4$ | $2,2$<br>$0 \text{ à } 7,5$   | $1,5$<br>$0 \text{ à } 5,3$ | $3,8$<br>$0 \text{ à } 7,6$   | $0,5$<br>$0 \text{ à } 1,5$ | $0,6$<br>$0 \text{ à } 1,7$   | $15,1$<br>$4,9 \text{ à } 27,6$  | 6,6                                        |
| Cancer utérin (2 cas) . . . . .                                   | $10,3$<br>$6 \text{ à } 14,6$  | $1,8$<br>$1,3 \text{ à } 3,4$ | $2,9$<br>$2,9$              | $3,6$<br>$1,8 \text{ à } 5,4$ | $2,7$<br>$0 \text{ à } 5,5$ | $1,7$<br>$1,1 \text{ à } 2,3$ | $23,1$<br>$15,2 \text{ à } 32,5$ | 9,6                                        |
| Ménopause (3 cas) . . . . .                                       | $6,4$<br>$5,3 - 12,8$          | $2,9$<br>$0,2 - 10,0$         | $2,9$<br>$0 - 9,2$          | $5,1$<br>$2,3 - 11,2$         | nul<br>nul                  | $0,5$<br>$0 - 0,8$            | $20,5$<br>$9,0 - 43,2$           | 4,0                                        |
| Tumeur ovarienne; ovaire contro-latéral (2 cas) . . . . .         | $6,6$<br>$4,8 - 8,2$           | $1,9$<br>$1,9$                | $1,6$<br>$0,6 - 2,6$        | $3,1$<br>$2,5 - 3,7$          | $0,8$<br>$0 - 1,6$          | $0,2$<br>nul - $0,4$          | $14,2$<br>$13,8 - 14,7$          | 6,6                                        |

raison des résultats obtenus par une technique identique dans différents tissus a le grand intérêt de permettre l'étude des pourcentages relatifs des différents œstrogènes. Elle nous a en particulier permis de vérifier l'existence d'une sorte de gradient métabolique se traduisant par la disparition progressive de l'œstradiol, hormone ovarienne, et l'apparition d'œstriol au niveau de l'endomètre.

### *Dosage des œstrogènes dans les ovaires entiers*

**1° Résultats personnels.** — Nous avons effectué le dosage des œstrogènes libres et conjugués (mélange des fractions II et III) (tableau V bis), libérés successivement par hydrolyse enzymatique et acide, dans 18 ovaires après exérèse des corps jaunes en activité ou des kystes volumineux.

Ces ovaires ont été prélevés habituellement chez des femmes en période d'activité génitale, opérées dans la plupart des cas pour des fibromyomes utérins ou plus rarement pour un cancer utérin au début. Dans 2 cas, nous avons également dosé les œstrogènes contenus dans les ovaires du côté opposé à une tumeur ovarienne.

*Le tableau XVII montre que les ovaires ne contiennent habituellement que peu d'œstrogènes* (valeur globale moyenne  $17,7 \pm 8,5$   $\mu\text{g}/100$  grammes de tissu frais). *Ceux-ci sont pour les deux tiers sous forme libre avec une nette prédominance de l'œstrone.*

En raison des quantités infimes constatées, nous n'avons pas pu effectuer de réactions d'identité permettant d'affirmer avec certitude la nature des hormones mesurées.

Les œstrogènes conjugués sont encore moins abondants, consistant presque uniquement en œstrone, l'œstradiol et l'œstriol conjugués étant le plus souvent indosables ou à la limite inférieure de la sensibilité de la technique.

*Nous avons tenté d'établir une relation entre les troubles gynécologiques observés et la teneur en œstrogènes des ovaires étudiés.*

Le tableau XVII indique que des écarts individuels importants rendent l'interprétation des résultats très difficile. On peut cependant noter que les 2 ovaires étudiés chez des femmes porteuses de cancer utérin ont un poids moyen élevé (9,6 grammes au lieu de 5 grammes en moyenne pour la totalité des cas), coïncidant avec une concentration globale pour 100 grammes de tissu frais également plus forte que la moyenne (23,1  $\mu\text{g}$  au lieu de 17,7  $\mu\text{g}$ ). Ces résultats concordent avec l'hypothèse généralement admise de l'hyperœstrogénie des cancers utérins.

A l'inverse, les 3 ovaires de femmes ménopausées étudiés ont une concentration globale moyenne de 20,5  $\mu\text{g}/100$  ml, mais un poids moyen beaucoup plus faible (4 grammes seulement).

Les poids moyens et les concentrations globales moyennes sont identiques chez les femmes porteuses de fibromyome ou de polype utérin et dans les ovaires opposés à une tumeur ovarienne.

2° *Données de la littérature.* — Nous ne voulons pas insister sur les expériences de perfusion d'ovaire de truie (Werthessen et collaborateurs, 1953) ou plus récemment de vache (Romanoff et Pincus, 1962) qui ont, de même que les incubations de fragments d'ovaires avec de l'acétate radio-actif (Rabinowitz, 1956; Wotiz et Lemon, 1958; O'Donnel et Mc Caig, 1959), mis en évidence la réalité de la synthèse de l'œstrone et de l'œstradiol par l'ovaire humain.

Il existe dans la littérature peu de dosages effectués directement dans le tissu ovarien.

Nous avons parlé précédemment des mesures faites par Zander et collaborateurs (1959), Short (1960-1961), Smith (1960) dans les liquides folliculaires et nous ne parlerons ici que des dosages effectués sur l'ovaire entier, nous proposant de revenir prochainement sur le problème particulier des corps jaunes.

W. Shild (1961) utilise une technique de dosage assez voisine de la nôtre, comprenant l'hydrolyse et l'extraction des tissus selon la méthode de Diczfalusy et Lindkvist, puis une chromatographie sur colonne d'alumine, suivie de fluorimétrie selon la méthode d'Ittrich (1958).

Par cette méthode, Shild a étudié deux lots d'ovaires prélevés lors d'interventions chirurgicales.

Dans le premier lot (45 grammes), il a pu constater la présence d'œstrone libre uniquement (3,5 µg) et, dans le deuxième lot (68 grammes) où existaient sur deux ovaires des gros kystes folliculaires, de la taille d'une noix, il a mis en évidence de l'œstrone libre et conjugué, ainsi que de l'œstradiol et de l'œstriol conjugués. Ces trois hormones libres et conjuguées atteignent une valeur globale de 17,3 µg avec 11,9 µg d'œstrogènes libres dont 6,4 µg d'œstrone, résultats en parfaite concordance avec ceux que nous avons obtenus.

Keckes et collaborateurs (1962) ont d'autre part étudié par chromatographies sur papier suivies de réactions colorées *in situ* les œstrogènes dans quatre ovaires prélevés chez des femmes normalement réglées. Il a obtenu des valeurs moyennes beaucoup plus élevées : 0,54 µg d'œstrone, 0,62 µg d'œstradiol, 0,24 µg d'œstriol, soit 1,40 µg d'œstrogènes totaux par gramme de tissu.

Il a constaté des taux encore plus élevés au cours de la grossesse et, fait plus surprenant, dans les syndromes de Stein-Leventhal.

Il semble que ces résultats doivent être admis sous réserve, la chromatographie sur papier n'étant précédée que d'un simple dégraissage entre alcool méthylique et benzène.

Nous citerons pour terminer les résultats de Beling (in Diczfalusy et

TABLEAU XVIII. — DOSAGE DES ŒSTROGÈNES DANS LES CORPS JAUNES.  
Exprimés en  $\mu\text{g}$  par 100 grammes de tissu frais.

|                                                                                                                                                 | Poids<br>des corps<br>jaunes<br>étudiés | Œstrogènes libres |               |                 | Œstrogènes conjugués |               |                | Œstrogènes<br>totaux |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------|---------------|-----------------|----------------------|---------------|----------------|----------------------|
|                                                                                                                                                 |                                         | Œstrone           | Œstradiol     | Œstriol         | Œstrone              | Œstradiol     | Œstriol        |                      |
| Au cours de la<br>grossesse (6 <sup>e</sup> à<br>14 <sup>e</sup> semaines) :<br>11 dosages.<br>Moyenne $\pm$ dé-<br>viation stan-<br>dard ..... | 7,0 $\pm$ 4,3                           | 9,7 $\pm$ 6,8     | 4,1 $\pm$ 2,7 | 7,9 $\pm$ 6,1   | 6,6 $\pm$ 6,0        | 3,8 $\pm$ 3,8 | 8,5 $\pm$ 7,4  | 40,6 $\pm$ 27,2      |
| Au cours du<br>cycle mens-<br>truel : 19 do-<br>sages corres-<br>pondant à<br>20 corps jau-<br>nes. Moyenne<br>$\pm$ déviation<br>standard .... | 1,6 $\pm$ 0,8                           | 11,6 $\pm$ 10,6   | 4,7 $\pm$ 4,0 | 12,6 $\pm$ 11,0 | 7,3 $\pm$ 5,7        | 2,0 $\pm$ 2,0 | 12,2 $\pm$ 8,6 | 50,4 $\pm$ 28,4      |

Le pourcentage des divers œstrogènes et leur concentration globale sont voisins, au cours de la grossesse et du cycle menstruel. Par contre, le poids moyen des corps jaunes gestatifs est quatre fois plus élevé, d'où une quantité d'œstrogènes beaucoup plus forte par unité.

Lauritzen, 1961). Alors que sur des ovaires frais il ne trouvait que de l'œstrone et un peu d'œstradiol, dans les ovaires prélevés lors d'autopsies il a pu identifier également de l'œstriol conjugué (50 à 60  $\mu\text{g}$  par ovaire).

### *Dosage des œstrogènes dans les corps jaunes*

**1° Résultats personnels.** — Nous avons effectué le dosage des œstrogènes dans 31 corps jaunes; 11 d'entre eux ont été prélevés au cours de la grossesse de la 6<sup>e</sup> à la 14<sup>e</sup> semaine, lors d'avortements thérapeutiques ou d'interventions chirurgicales diverses. Les 20 autres corps jaunes ont été prélevés au cours d'interventions gynécologiques effectuées en phase lutéale à cette intention par M. le professeur agrégé Granjon.

Le tableau XVIII montre que les corps jaunes sont beaucoup plus riches en œstrogènes que le reste de l'ovaire.

Dans les deux groupes, la proportion respective des œstrogènes et leur taux global moyen sont voisins ( $40,6 \pm 27,2$   $\mu\text{g}$  au cours de la grossesse,  $50,4 \pm 28,4$   $\mu\text{g}/100$  grammes au cours du cycle menstruel).

Les œstrogènes libres sont légèrement plus élevés que les conjugués, l'œstradiol libre et surtout conjugué est très peu abondant (ce dernier est d'ailleurs inférieur à la sensibilité de la technique dans le tiers des cas environ). La concentration de l'œstrone est plus élevée et égale à celle de l'œstriol.

Le poids des corps jaunes par contre est extrêmement différent dans les deux catégories. Au cours de la grossesse, où ils sont souvent kystiques, le poids moyen est de 7 grammes, avec seulement 2 corps jaunes de poids inférieur à 2,5 grammes. Pendant le cycle menstruel, le poids moyen n'est que de 1,6 gramme, avec 15 corps jaunes de poids inférieur à 2,5 grammes. La différence entre ces poids moyens est statistiquement très significative.

$$\left\{ \begin{array}{l} t = \text{variable réduite de Student} = 5,5 \\ p (\text{probabilité de l'hypothèse hasard}) < 0,001. \end{array} \right.$$

Il est par suite aisé de calculer que la quantité d'œstrogènes contenue dans chaque corps jaune est quatre fois plus élevée au cours de la grossesse (3,32  $\mu\text{g}$  dont 1,15  $\mu\text{g}$  d'œstriol) qu'au cours du cycle menstruel (0,81  $\mu\text{g}$  dont 0,40  $\mu\text{g}$  d'œstriol).

Edwards (1962) a également constaté récemment que chez la vache le poids du corps gestatif est plus élevé que celui du corps jaune périodique.

Il a remarqué aussi que le corps jaune gestatif augmente jusqu'au 2<sup>e</sup>-3<sup>e</sup> mois puis régresse, mais nous n'avons pas pu noter de relation entre l'âge de la grossesse et le poids du corps jaune. Nous avons par contre pu constater que la concentration semble inversement proportionnelle au poids du corps jaune gestatif. En effet, la concentration totale la plus élevée (134,9  $\mu\text{g}/100$  grammes) a été observée dans le plus petit corps jaune prélevé

(1,5 gramme) et la concentration la plus faible (5,0  $\mu\text{g}/100$  grammes) dans le corps jaune le plus gros (13,2 grammes). Ce phénomène étant à rapprocher d'une constatation identique faite précédemment pour les kystes folliculaires où la concentration en œstrogènes semble inversement proportionnelle au volume du liquide.

Il nous a également semblé que les corps jaunes périodiques étaient les plus riches en œstrogènes.

|                                                                  | <i>Poids inférieur<br/>à 2,5 grammes</i> | <i>Poids supérieur<br/>ou égal à 2,5 grammes</i> |
|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| <i>Au cours de la grossesse</i> .....                            | 2 cas                                    | 9 cas                                            |
| Valeur moyenne globale en $\mu\text{g}$ par<br>100 grammes ..... | 95,4<br>(55 et 134,9)                    | 26,1<br>(de 5,0 à 56,5)                          |
| <i>Au cours du cycle menstruel</i> .....                         | 15 cas                                   | 5 cas                                            |
| Valeur moyenne globale .....                                     | 59                                       | 27,1                                             |

Nous n'avons pas de *preuves formelles* de la nature exacte des hormones trouvées; cependant, outre leur *comportement chromatographique* identique à celui des hormones standards sur colonne de célite aussi bien que sur couche mince de gel de silice, ces diverses fractions isolées présentent *les mêmes maxima d'excitation et d'émission* que les hormones pures correspondantes, et *les spectres d'absorption de la réaction de Brown* (micro-méthode Brown et Roy, 1960) présentent également des longueurs d'onde maxima identiques à celles des hormones pures. Les faibles quantités en présence nous ont empêché de faire une identification plus précise.

**2° Données de la littérature et discussions.** — Allen et collaborateurs (1930), puis Clauberg (1936) et Gluckman (1941) ont pu observer par dosage biologique une activité œstrogénique importante dans les corps jaunes gestatifs ou périodiques, avec une diminution de celle-ci en fin de grossesse ou à partir du 22<sup>e</sup> jour du cycle.

Clauberg a d'ailleurs trouvé 0,6 à 0,8  $\mu\text{g}$  d'équivalent d'œstrone par ovaire au cours du cycle menstruel, quantité identique à celle que nous avons personnellement constatée.

Plus récemment, par dosage chimique, accompagné de réactions d'identification, Zander, Diczfalusy et collaborateurs (1959), au cours de mesures effectuées simultanément à Cologne et à Stockholm, ont trouvé aussi des œstrogènes dans les corps jaunes de la deuxième moitié du cycle et du 4<sup>e</sup> mois de la grossesse. Ces auteurs n'ont comme nous pas retrouvé de différence quantitative ou qualitative entre les corps jaunes périodiques et gestatifs, ce qui les a amenés à penser que la sécrétion œstrogénique ovarienne n'a qu'une faible importance en comparaison de celle du placenta. Ceci expliquerait que l'excrétion urinaire soit virtuellement inchangée après ovariectomie bilatérale pendant la grossesse.

Ils ont constaté que l'œstradiol-17 $\beta$  était l'œstrogène le plus abondant et constamment retrouvé avec une valeur moyenne de 0,2  $\mu$ g par 100 grammes de tissu frais. L'œstrone était également dosable, dans presque tous les extraits, mais en quantité moindre.

Ces auteurs n'ont pu affirmer la présence d'œstriol que dans deux cas sur six. Ce dernier fait est en désaccord avec la démonstration histo-chimique par Furuhjelm (1954) d'œstriol dans le corps jaune humain.

Il est intéressant de constater qu'en dépit de quelques différences avec nos résultats leur concentration moyenne pour les fractions œstradiol-17 $\beta$  + œstrone est de 30  $\mu$ g par 100 grammes de tissu frais, alors que pour nos mesures elle est de 30,5  $\mu$ g au cours de la grossesse et 25,6  $\mu$ g au cours du cycle menstruel.

Zander et collaborateurs ont, d'après cette valeur, pu calculer que la formation quotidienne d'œstrogènes dans le corps jaune périodique doit s'élever à environ 300  $\mu$ g/24 heures (1.000 fois la quantité contenue dans chaque corps jaune), ce qui concorde parfaitement avec les calculs de Corner (1947) sur la quantité d'œstrogènes nécessaire pour produire un saignement chez les femmes ovariectomisées, et avec ceux de Smith et collaborateurs (1943) et de Brown (1957) basés sur des considérations métaboliques.

Le défaut de mise en évidence de l'œstriol dans leurs extraits, alors que nous en avons personnellement presque toujours trouvé, est peut être dû au fait que la mesure fluorimétrique que nous utilisons est beaucoup plus sensible que la réaction de Kober, même modifiée par Brown (1955) ou par Ittrich (1958).

**3° Présence d'autres œstrogènes.** — En plus de l'œstradiol-17 $\beta$  et de l'œstrone, Zander et collaborateurs ont détecté au moins 5 stéroïdes additionnels par chromatographie sur papier des extraits mélangés de plusieurs corps jaunes, mais ils ne purent les identifier.

Nous avons effectué à plusieurs reprises une pareille recherche sur des extraits mélangés de corps jaunes.

Ces extraits furent préparés selon la méthode de Diczfalusy et Munstermann (1959) : broyage du tissu, extraction par l'alcool à 80 %, puis absolu, évaporation sous azote. Extraction du résidu aqueux par l'éther. Évaporation à température modérée, dissolution dans l'alcool méthylique à 50 % que l'on lave avec de l'éther de pétrole et que l'on dilue ensuite à 25 % avant de le réextraire par le chloroforme. On évapore le chloroforme, on reprend par du tétrachlorure de carbone, que l'on ré extrait par du méthanol à 60 %. Celui-ci est enfin évaporé et le résidu aqueux extrait par l'éther. Ces solutions éthérées sont ensuite chromatographiées sur papier et surtout sur couche mince de gel de silice Merck (Lisboa et Diczfalusy, 1962).

Nous avons pu ainsi, par l'emploi de diverses réactions colorées, en particulier la réaction de Folin-Ciocalteu, caractéristique des substances

TABLEAU XIX. — NATURE DES DIVERS ŒSTROGÈNES  
RETROUVÉS DANS LES CORPS JAUNES.

| Poids                                                                                                 | Œstrone | Œstra-<br>diol-17 $\beta$ | 16 $\alpha$ -OH-<br>œstrone | 16-céto-<br>œstrone                                | Œstriol | 16-épi-<br>Œstriol |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|---------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------------|---------|--------------------|
| <i>Chromatographie sur papier système Kushinsky et coll. (1960) :</i>                                 |         |                           |                             |                                                    |         |                    |
| — 2,3 grammes (pool) :                                                                                |         |                           |                             |                                                    |         |                    |
| - libres .....                                                                                        | +       |                           | +                           |                                                    | +       | +                  |
| - conjugués .....                                                                                     | +       |                           | +                           | 16-céto-<br>œstrone<br>ou<br>16-céto-<br>œstradiol | +       | +                  |
| <i>Chromatographie sur couche mince de gel de silice (systèmes A, B, C de Lisboa et Diczfalusy) :</i> |         |                           |                             |                                                    |         |                    |
| — 3,9 grammes :                                                                                       |         |                           |                             |                                                    |         |                    |
| - libres .....                                                                                        |         |                           |                             |                                                    |         |                    |
| - conjugués .....                                                                                     | +       | +                         | +                           |                                                    | +       | +                  |
| — 7,6 grammes (pool) :                                                                                |         |                           |                             |                                                    |         |                    |
| - libres .....                                                                                        | +       |                           |                             |                                                    | +       | +                  |
| - conjugués .....                                                                                     | +       | +                         |                             |                                                    | ++      | +                  |
| — 10,3 grammes (pool)                                                                                 |         |                           |                             |                                                    |         |                    |
| - libres .....                                                                                        | +       | +                         |                             |                                                    | +       | +                  |
| - conjugués .....                                                                                     | +       | +                         | traces                      | 16-céto-<br>œstrone ?                              | ?       |                    |
| — 2,4 grammes (pool) :                                                                                |         |                           |                             |                                                    |         |                    |
| - libres .....                                                                                        |         |                           |                             |                                                    |         |                    |
| - conjugués .....                                                                                     | +       | +                         | traces                      |                                                    | +       | traces             |

réductrices, et la réaction de Miescher modifiée par Lisboa et Diczfalusy (1963) (anisaldéhyde - anhydride acétique - acide sulfurique) où les différents œstrogènes présentent des réactions colorées caractéristiques, retrouver l'œstrone, l'œstradiol-17 $\beta$  et l'œstriol précédemment dosés quantitativement (tableau XIX). Nous avons aussi pu constater la présence dans tous les corps jaunes d'une *substance polaire de même comportement chromatographique que la 16 $\alpha$ -OH-œstrone*, et présentant la même *coloration violette* que cette hormone avec le réactif de Miescher. Cette substance dont la *nature cétonique* a été confirmée grâce à une séparation par le réactif T de Girard n'a malheureusement pas pu être encore formellement identifiée.

Il existe en outre dans tous les extraits de corps jaunes une substance *non cétonique* qui, en chromatographie sur papier comme sur couche mince, a la même migration et les mêmes réactions colorées que le 16-épi-œstriol.

**Dosage des œstrogènes  
dans le muscle utérin  
et dans les fibromyomes**

1° Nous avons également effectué le dosage des œstrogènes dans 21 fragments de myomètre après grattage de l'endomètre sur la pièce opératoire.

Les utérus ont été prélevés pour des raisons diverses : métrorragies post-ménopausiques dans deux cas, tumeurs ovariennes dans deux cas également, ou, en général, pour des polypes endométriaux, des cancers au début et des fibromyomes chez des femmes en période d'activité génitale.

Ces utérus pesaient de 55 à 895 grammes (il s'agissait pour ce dernier d'un utérus enlevé pour de nombreux myomes lors d'une césarienne à terme); les dosages ont été effectués dans chaque cas sur 50 grammes de tissu environ.

Le tableau XX montre que les quantités obtenues sont minimes (valeur globale moyenne : 4,4 µg/100 grammes de tissu frais). Les œstrogènes libres sont légèrement supérieurs aux conjugués. L'œstrone est le plus abondant mais ne dépasse pas 3,6 µg/100 grammes. Les taux d'œstradiol sont les plus bas, surtout pour la fraction conjuguée (6 cas nuls sur 21, avec une valeur moyenne pratiquement nulle).

Il existe presque toujours de l'œstriol dans les deux fractions libres et conjuguées, mais le plus souvent à l'état de traces seulement.

TABLEAU XX. — DOSAGE DES ŒSTROGÈNES DANS LE MUSCLE UTÉRIN ET DANS LES FIBROMYOMES.  
Résultats exprimés en µg/100 grammes de tissu frais.

|                                | Œstrogènes libres |           |           | Œstrogènes conjugués |                      |                      | Œstrogènes totaux |
|--------------------------------|-------------------|-----------|-----------|----------------------|----------------------|----------------------|-------------------|
|                                | Œstrone           | Œstradiol | Œstriol   | Œstrone              | Œstradiol            | Œstriol              |                   |
| Muscle utérin (21 dosages) ... |                   |           |           |                      |                      |                      |                   |
| Moyenne ± déviation standard   | 1,7 ± 1,0         | 0,6 ± 0,3 | 0,8 ± 0,4 | 0,8 ± 0,4            | 0,2 ± 0,2<br>(± nul) | 0,3 ± 0,1<br>(± nul) | 4,4 ± 2,6         |
| Fibromyome (15 dosages) ....   |                   |           |           |                      |                      |                      |                   |
| Moyenne ± déviation standard   | 1,5 ± 0,8         | 0,8 ± 0,6 | 1,3 ± 1,3 | 1,2 ± 1,0            | 0,3 ± 0,3            | 0,7 ± 0,5            | 5,8 ± 2,5         |

TABLEAU XXI. — COMPARAISON ENTRE UTÉRUS FIBROMATEUX OU FIBROME ET MUQUEUSE UTÉRINE PRÉLEVÉS SIMULTANÉMENT.  
ESTROGÈNES TOTAUX EN  $\mu\text{g}$  100 grammes.

| Noms                                      | Fibrome ou myomètre           | Muqueuse utérine                |
|-------------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| Plu... ..                                 | 16,1                          | 514,0                           |
| Lar... ..                                 | Libres seul <sup>nt</sup> 1,6 | Libres seul <sup>nt</sup> 137,2 |
| Rian... ..                                | 3,2                           | 132,0                           |
| Wai... ..                                 | Myomètre 2,2                  | 38,4                            |
|                                           | Fibromyome 1,7                |                                 |
| Bou... ..                                 | 8,8                           | 60,0                            |
| Biz... ..                                 | 5,1                           | 417,0                           |
| Ler... ..                                 | 6,7                           | 94,9                            |
| Moyenne $\pm$ déviation<br>standard ..... | (5,6 $\pm$ 5,1)               | (185,3 $\pm$ 188,1)             |

Les concentrations tissulaires dans le myomètre *sont beaucoup trop minimales pour que nous ayons pu faire des réactions d'identification*, nous nous sommes limitée à vérifier que la fluorescence des extraits avait les mêmes longueurs d'onde maxima d'excitation et d'émission que les hormones pures correspondantes.

Nous avons également pu constater que la *récupération* moyenne, après addition de 10  $\mu\text{g}$  d'hormone pure aux extraits éthéro-toluéniques, était de 52 % ; récupération évidemment assez faible, mais permettant cependant de conclure que la quasi-absence d'œstrogènes dans le myomètre est bien réelle.

Baum, Krekeler et Stengele (1957), par une méthode de dosage colorimétrique quantitative de l'œstradiol et de l'œstrone dans les tissus, comprenant une purification avec de la potasse alcoolique et une séparation par le réactif T de Girard, suivie d'une réaction de Kober, ont également constaté que le myomètre comme les tumeurs musculaires ne contenait pas d'œstrogènes en dépit d'une récupération d'hormone pure correcte (70 %  $\pm$  7,5 %).

2° Nous avons de même effectué le dosage des œstrogènes dans 15 fibromyomes utérins pesant de 8,3 à 470 grammes. Là aussi les œstrogènes sont quasiment nuls (valeur moyenne globale : 5,8  $\pm$  2,5  $\mu\text{g}$  par 100 grammes de tissu frais).

Les œstrogènes libres sont légèrement plus abondants que les conjugués, avec une prédominance de l'œstrone qui ne dépasse d'ailleurs pas 3,2  $\mu\text{g}$  100 grammes.

L'œstradiol est indosable dans 2 cas pour la fraction libre et dans 7 cas pour la fraction conjuguée où sa valeur moyenne est pratiquement

nulle. Seul l'œstriol est légèrement plus abondant que dans le muscle utérin, atteignant dans un cas 6,9 µg/100 grammes sous forme libre.

Comme précédemment le fragment étudié lors d'une césarienne à terme n'est pas plus riche que ceux prélevés en dehors de la grossesse.

3° Nous avons au cours de ce travail effectué le *dosage comparatif des œstrogènes totaux dans la muqueuse utérine et dans les fragments de myomètre ou de fibrome*.

Nous avons vu comme l'indique le tableau XXI que l'endomètre prélevé simultanément est beaucoup plus riche que le reste de l'utérus (valeur moyenne : respectivement 185,3 µg et 5,6 µg d'œstrogènes totaux pour 100 grammes de tissu frais).

### *Dosage des œstrogènes dans la muqueuse utérine*

Un certain nombre de faits que nous avons énoncés précédemment, tels que : l'absence d'œstriol dans le sang de femmes hystérectomisées, même en cas d'activité fonctionnelle des ovaires restants, ou son défaut d'apparition après administration d'œstradiol, si celle-ci est précédée d'une hystérectomie ou d'un simple curetage de l'endomètre, nous ont amenés à doser directement les œstrogènes dans la muqueuse utérine.

**1° Technique.** — Les fragments d'endomètre ont été prélevés par curetage biopsique, par grattage de la pièce d'hystérectomie ou plus rarement par biopsie. Ils ont été broyés au mortier en présence de quartz, avant d'être extraits par l'alcool éthylique à 80°, puis absolu, et traités comme nous l'avons décrit précédemment.

La méthode employée a été soumise aux vérifications méthodologiques habituelles. Dans le cas des muqueuses utérines, nous avons pu constater

que la précision calculée selon la méthode de Snedecor  $s = \sqrt{\frac{\sum d^2}{2 N}}$  était,

d'après une série de 5 dosages effectués en double :

œstrone : 2,9 µg/100 grammes de tissu frais,  
œstradiol : 2,2 µg/100 grammes de tissu frais,  
œstriol : 3,7 µg/100 grammes de tissu frais.

La sensibilité de la méthode, calculée dans les mêmes conditions ( $t s / \sqrt{N}$ ) étant respectivement 1,8 µg, 1,4 µg et 2,3 µg/100 grammes.

La spécificité de la technique a été vérifiée avec un soin particulier pour l'œstriol, nous y reviendrons ultérieurement après l'exposé des résultats obtenus.

Nous avons ainsi étudié les muqueuses utérines de 53 femmes. Le poids moyen était de 1,5 gramme. Trente-six malades avaient des antécédents de

TABLEAU XXII. — TENEUR EN ŒSTROGÈNES DE LA MUQUEUSE UTÉRINE.  
Exprimée en  $\mu\text{g}/100$  grammes de tissus frais. Moyenne  $\pm$  déviation standard.

|                              | Œstrogènes libres |               |                  | Œstrogènes conjugués |               |                 | Total             |
|------------------------------|-------------------|---------------|------------------|----------------------|---------------|-----------------|-------------------|
|                              | Œstrone           | Œstradiol     | Œstriol          | Œstrone              | Œstradiol     | Œstriol         |                   |
| Phase folliculaire (18 cas)  | $18,5 \pm 14,3$   | $4,5 \pm 4,5$ | $30,6 \pm 24,4$  | $9,0 \pm 7,5$        | $\pm$ nul     | $13,0 \pm 11,7$ | $75,8 \pm 47,8$   |
| Phase lutéale (24 cas) . . . | $15,0 \pm 14,5$   | $3,8 \pm 3,8$ | $107,0 \pm 92,4$ | $6,5 \pm 5,9$        | $1,9 \pm 1,9$ | $17,8 \pm 16,2$ | $152,3 \pm 117,0$ |

La différence n'est pas significative pour l'œstriol conjugué :  $t = 1,0$ ;  $p = 0,1$ .

La différence est très significative entre les deux phases du cycle menstruel pour l'œstriol libre :  $t =$  variable réduite de Student-Fisher  $= 3,48$ ;  $p =$  probabilité de l'hypothèse hasard  $= 0,001$ . Elle l'est également pour les œstrogènes totaux :  $t = 2,51$ ;  $0,02 < p < 0,01$ .

métrorragies ou de règles anormalement abondantes. L'étude anatomo-pathologique de l'endomètre a été effectuée simultanément de façon systématique.

**2° Résultats.** — Nous avons pu constater (tableau XXII) une différence significative entre les œstrogènes totaux en phases folliculaire et lutéale. Ceux-ci atteignent une valeur moyenne de  $152,3 \mu\text{g}/100$  grammes de tissu dans la deuxième partie du cycle, alors que la teneur moyenne n'est que de  $75,8 \mu\text{g}/100$  grammes en phase folliculaire.

La différence porte uniquement sur l'œstriol libre et conjugué, le pourcentage d'œstriol était de 57 % en phase folliculaire, alors qu'il atteint 81 % en phase lutéale, avec 70 % d'œstriol libre.

L'œstradiol libre et conjugué, l'œstrone conjugué par contre sont faibles, souvent indosables ou à la limite de la sensibilité de la technique.

Ces modifications de la concentration en œstrogènes au cours du cycle menstruel sont physiologiques, puisqu'elles sont retrouvées aussi bien chez les 15 femmes n'ayant jamais eu de saignement anormal (femmes témoins et fibromes n'ayant jamais saigné) que chez les 27 femmes non ménopausées présentant des métrorragies plus ou moins importantes, hémorragies fonctionnelles ou dues à la maladie fibromyomateuse.

Dans ces quatre catégories le pourcentage moyen du rapport

$$\frac{\text{œstriol libre} + \text{conjugué}}{\text{œstrogènes totaux}}$$
 est compris entre 50 et 54 % en phase lutéale.

*La richesse en œstrogènes, et surtout en œstriol de l'endomètre, est tout à fait exceptionnelle; en effet, seul le placenta contient des quantités comparables.*

La différence importante (et d'ailleurs statistiquement significative) entre les concentrations d'œstriol en phases folliculaire et lutéale apporte un argument de poids à la théorie que nous avons soutenue à l'issue de nos résultats antérieurs, selon laquelle l'œstriol se forme dans l'organisme humain sous l'action conjuguée de l'endomètre et du corps jaune.

### **3° Identification de l'œstriol dans les extraits de muqueuse utérine.**

— La présence d'œstriol dans l'endomètre humain en quantités aussi considérables et aussi inhabituelles nous a semblé devoir être confirmée par une identification formelle de ce stéroïde.

A cet effet, nous avons pu réaliser grâce à l'efficace collaboration de tout le personnel médical et infirmier de la Maternité trois collectes successives de muqueuse utérine (14,76, 12,45 et 15,97 grammes chacune). La première et la troisième, les plus riches en œstriol libre (respectivement 50 et 8 µg après dosage fluorimétrique) correspondaient, pour au moins la moitié des prélèvements, à des phases lutéales chez des femmes porteuses de fibromes utérins, alors que la deuxième collecte (2,5 µg seulement) correspondait pour la plupart à des femmes en phase folliculaire sans antécédent métrorragique.

Nous avons pu observer dans les extraits correspondant à la fraction œstriol des première et troisième collectes, après chromatographie sur célite, le faisceau d'arguments suivants :

*a) Les extraits ont le même comportement chromatographique et la même longueur d'onde maxima d'excitation et d'émission de la fluorescence dans l'acide sulfurique à 88 % (respectivement 455 et 482 mµ).*

*b) La réaction de David (modification d'Axelson et Diczfalusy, 1961), spécifique de l'œstriol, a montré que les extraits biologiques présentaient la même courbe d'absorption en lumière visible qu'une quantité équivalente d'hormone pure, tant pour la longueur d'onde maxima (630 mµ) que pour la densité optique lue dans des microcuvettes à l'Unicam S.P. 500.*

*c) La courbe d'absorption de la réaction de Brown (microréaction selon Brown et Roy, 1960) présentait le même maximum à 516 mµ que l'hormone pure et, après correction d'Allen et comparaison avec l'œstriol pur, les quantités mesurées par fluorimétrie et par colorimétrie se sont trouvées identiques (dans 2 cas mesurés individuellement en dehors du pool).*

**d) La courbe d'absorption en lumière ultraviolette.**

— dans le méthanol suivait une courbe strictement parallèle pour 5  $\mu\text{g}$  d'œstriol pur et une quantité d'extrait d'endomètre équivalente;

— dans l'acide sulfurique pur après un séjour de 2 heures à l'obscurité (microméthode d'après Burnstein et Leenhardt, 1953), l'extrait précédent présentait les mêmes longueurs d'onde maxima et minima d'absorption que

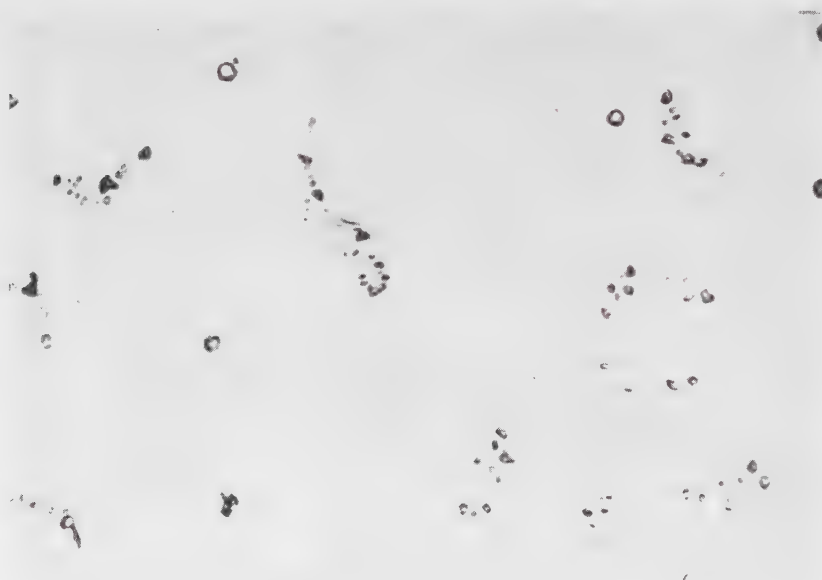


FIG. 18. - *Microcristaux d'œstriol obtenus par microsublimation selon la technique de Breuer et Kassau (1960) à partir d'extraits d'endomètre humain.*

l'hormone pure avec cependant de légères différences quantitatives (Min 260  $\text{m}\mu$ , Max 305  $\text{m}\mu$ ).

**e) La chromatographie sur couche mince de gel de silice** dans le système A de Lisboa et Diczfalusy (1962) [acétate d'éthyle (45); cyclohexane (45); éthanol (10)] a montré que la fraction œstriol préparée à partir de l'endomètre ne contenait après révélation par le réactif de Folin-Ciocalteu qu'une tache de  $\text{rf}$  identique à celui de l'œstriol pur et quantitativement comparable à la quantité mesurée par fluorimétrie (3  $\mu\text{g}$ ).

Le premier éluat habituellement jeté contenait au contraire des impuretés plus polaires que l'œstriol et une tache de  $\text{rf}$  identique au 16-épi-œstriol.

**f) La méthylation et la chromatographie sur colonne d'alumine** selon Brown (1956) effectuées dans le laboratoire du professeur Breuer à Bonn ont permis

l'isolement d'œstriol méthyl-éther présentant une courbe d'absorption typique de cette substance (Max 516 m $\mu$ ) et correspondant après correction d'Allen à 22,8  $\mu$ g d'œstriol.

g) Enfin R. Ozon a obtenu par **microsublimation** selon la technique de Breuer et Kassau (1960) la formation de microcristaux dont l'allure morphologique (fig. 18), la température de microsublimation (240-250° C) et le point de fusion étaient très voisins de ceux de l'œstriol pur.

Il nous semble donc que la substance mesurée par fluorescence dans l'endomètre humain est bien identique à de l'œstriol car elle présente la même fluorescence, qualitativement et quantitativement les mêmes courbes d'absorption :

- en lumière visible :
  - de la réaction de David,
  - de la réaction de Brown;
- en lumière ultraviolette :
  - dans le méthanol,
  - et dans l'acide sulfurique concentré;
- le même rf après chromatographie en couche mince;
- le même comportement après méthylation et chromatographie sur colonne d'alumine et mesure colorimétrique par la réaction de Brown.

Enfin, après microsublimation, nous avons pu observer des microcristaux de caractères physico-chimiques semblables.

La spectrographie infrarouge demande des quantités de stéroïdes trop importantes pour avoir pu être utilisée; cependant, *nous pensons pouvoir conclure sans contestation possible que la substance isolée à partir de l'endomètre humain était bien de l'œstriol.*

**4° Une étude plus approfondie et comportant en particulier la discussion des observations cliniques,** ainsi que l'émission de certaines hypothèses concernant les relations entre les métrorragies et le métabolisme des œstrogènes, a été entreprise à la suite de ces dosages par le docteur Santarelli, dans une thèse de doctorat en médecine (Paris, 1963).

Nous nous limiterons à exposer sans commentaire les résultats obtenus dans les diverses catégories de malades étudiées :

a) Le tableau XXIII montre que chez 9 femmes présentant des troubles gynécologiques divers (rétroversion, douleurs, prolapsus ou stérilité tubaire) la concentration moyenne totale des œstrogènes contenus dans l'endomètre ( $66,7 \pm 44,2$   $\mu$ g/100 grammes de tissu frais) est *beaucoup plus faible que chez les malades qui présentaient des antécédents de métrorragies* ou dans les muqueuses utérines prélevées en période de saignement.

De même, les endomètres des femmes porteuses de fibromes ou de polypes utérins n'ayant jamais entraîné de saignement anormal ont un

TABLEAU XXIII. — TENEUR EN ŒSTROGÈNES DE LA MUQUEUSE UTÉRINE, DANS LES CAS NORMAUX ET PATHOLOGIQUES.  
Exprimée en  $\mu\text{g}$  par 100 grammes de tissu.

|                                                                                                                                                            | Œstrogènes libres |                |                   | Œstrogènes conjugués |               |                 | Œstrogènes totaux |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|----------------|-------------------|----------------------|---------------|-----------------|-------------------|
|                                                                                                                                                            | Œstrone           | Œstradiol      | Œstriol           | Œstrone              | Œstradiol     | Œstriol         |                   |
| Témoins (9 cas) (5 phase folliculaire, 4 phase lutéale) . . . . .                                                                                          | 9,3 $\pm$ 9,1     | 1,4 $\pm$ 1,4  | 37,9 $\pm$ 32,6   | 6,2 $\pm$ 6,2        | nul           | 11,9 $\pm$ 11,5 | 66,7 $\pm$ 51,0   |
| Fibromes et polypes en dehors<br>ménopause et n'ayant jamais<br>saigné (6 cas) (5 phase folliculaire) . . . . .                                            | 8,6 $\pm$ 6,9     | 3,4 $\pm$ 3,4  | 19,7 $\pm$ 18,4   | 6,4 $\pm$ 6,1        | 0,5 $\pm$ 0,5 | 9,3 $\pm$ 7,9   | 47,9 $\pm$ 44,2   |
| Fibromes et polypes en dehors<br>ménopause ayant donné lieu<br>à hémorragie (10 cas) (11 do-<br>sages, 5 phase folliculaire,<br>6 phase lutéale) . . . . . | 29,3 $\pm$ 23,0   | 9,6 $\pm$ 9,3  | 54,9 $\pm$ 31,0   | 12,5 $\pm$ 11,6      | 2,7 $\pm$ 2,7 | 24,8 $\pm$ 22,1 | 133,8 $\pm$ 94,2  |
| Hémorragies fonctionnelles<br>(16 cas) (13 phase lutéale,<br>3 phase folliculaire) . . . . .                                                               | 14,1 $\pm$ 12,1   | 4,7 $\pm$ 4,0  | 129,2 $\pm$ 112,0 | 5,8 $\pm$ 4,8        | 1,3 $\pm$ 1,3 | 14,5 $\pm$ 12,6 | 169,6 $\pm$ 152,0 |
| Femmes en période de saigne-<br>ment (1 cas) . . . . .                                                                                                     | 39,5 $\pm$ 31,2   | 10,0 $\pm$ 8,6 | 109,5 $\pm$ 103,0 | 3,0 $\pm$ 2,2        | 1,3 $\pm$ 1,3 | 11,5 $\pm$ 10,5 | 174,8 $\pm$ 157,8 |
| Tuberculose avec muqueuse<br>atrophique (1 cas) . . . . .                                                                                                  | nul               | nul            | nul               | nul                  | nul           | nul             | nul               |
| Adénocarcinome (2 cas) . . . . .                                                                                                                           | 1,3               | 1,5            | 1,2               | 2,8                  | 1,7           | 0,7             | 9,2               |
| Ménopause (4 cas) . . . . .                                                                                                                                | 12,0 $\pm$ 10,4   | 1,4 $\pm$ 1,3  | 35,0 $\pm$ 27,0   | 6,2 $\pm$ 1,4        | 1,7 $\pm$ 1,6 | 6,3 $\pm$ 5,5   | 62,6 $\pm$ 46,0   |

taux moyen ( $47,9 \pm 44,2$   $\mu\text{g}/100$  grammes) beaucoup plus bas que si ces fibromes ont donné lieu récemment à des métrorragies ( $133,8 \pm 94,2$   $\mu\text{g}/100$  grammes) ou s'il existe des métrorragies fonctionnelles sans étiologie décelable ( $169,6 \pm 152,0$   $\mu\text{g}$ ).

Quatre endomètres prélevés en période de saignement avaient également une forte concentration en œstrogènes ( $174,8 \pm 157,8$   $\mu\text{g}/100$  grammes).

b) La séparation dans chacun de ces groupes des prélèvements effectués en phase folliculaire ou lutéale, afin d'éliminer une erreur d'interprétation due aux modifications physiologiques au cours du cycle menstruel que nous venons de citer, nous a permis de constater que, alors que pour les *hémorragies fonctionnelles* c'était surtout en *phase lutéale* que les œstrogènes étaient anormalement élevés (concentration totale :  $213,7$   $\mu\text{g}/100$  grammes, dont  $169,0$   $\mu\text{g}$  d'œstriol), pour les *fibromes avec métrorragies* ces *taux étaient déjà anormalement élevés en phase folliculaire* ( $171,4$   $\mu\text{g}/100$  grammes dont  $92,7$   $\mu\text{g}$  d'œstriol). Cette anomalie en phase folliculaire est à rapprocher de l'hyperœstrogénémie que nous avons observée à ce moment chez les femmes atteintes de fibromyomatose utérine.

c) Nous signalerons enfin que nous avons trouvé des œstrogènes en quantité notable après la ménopause chez 4 femmes. 3 d'entre elles présentaient des métrorragies, mais un endomètre prélevé chez une femme pourtant ménopausée depuis plusieurs années et opérée pour un prolapsus contenait  $62,2$   $\mu\text{g}/100$  grammes d'œstrogènes totaux, dont  $31,0$   $\mu\text{g}$  d'œstriol, valeurs à peine inférieures aux concentrations moyennes en phase folliculaire des autres sujets témoins, mais avec une quantité de muqueuse évidemment très faible.

Par contre, le dosage effectué dans 2 *adénocarcinomes* a montré des *taux très faibles* ( $12,0$   $\mu\text{g}/100$  grammes, d'œstrogènes totaux dans un cas,  $5,8$  dans l'autre), incitant à penser que l'hyperœstrogénie qui accompagne souvent les cancers de l'endomètre n'a pas pour origine la tumeur elle-même.

Enfin, le dosage effectué dans une tuberculose de l'endomètre avec *muqueuse histologiquement atrophique* a été rigoureusement nul, ce qui n'est pas pour nous surprendre.

### Conclusion

Le tableau récapitulatif des résultats que nous avons obtenus par le dosage des œstrogènes dans différents tissus humains (tableau XXIV) confirme l'opinion généralement admise que seuls l'œstrone et l'œstradiol sont des hormones ovariennes primitives, l'œstriol étant un produit de leur métabolisme ultérieur.

En effet, dans les *kystes folliculaires*, l'œstradiol prédomine, accompagné d'œstrone en quantités trois fois moindre et de traces d'œstriol seulement.

TABLEAU XXIV. — DOSAGE DES ŒSTROGÈNES DANS LES TISSUS.  
Valeurs moyennes exprimées en  $\mu\text{g}/100$  grammes de tissu frais  
ou 100 ml de liquide.

|                      | Nombre de dosages           | Œstrogènes libres    |           |         |  | Œstrogènes conjugués |           |         | Œstrogènes totaux<br>(en $\mu\text{g}$ ) |
|----------------------|-----------------------------|----------------------|-----------|---------|--|----------------------|-----------|---------|------------------------------------------|
|                      |                             | Œstrone              | Œstradiol | Œstrone |  | Œstrone              | Œstradiol | Œstriol |                                          |
| Kystes folliculaires | 71                          | Libres + conjugués : |           |         |  |                      |           |         |                                          |
|                      | — vol. < 5 ml (44)          | 7,2                  | 22,4      | 2,6     |  |                      |           |         | 32,2 $\pm$ 31,5                          |
|                      | — vol. > 5 ml (27)          | 10,2                 | 28,4      | 3,3     |  |                      |           |         | 41,9 $\pm$ 38,4                          |
| Ovaires . . . . .    | 18                          | 2,9                  | 12,6      | 1,7     |  |                      |           |         | 27,2 $\pm$ 25,4                          |
| Corps jaunes . . . . | 20 cycles : poids 1,6 g     | 7,1                  | 2,5       | 2,5     |  | 3,9                  | 0,7       | 1,0     | 17,7 $\pm$ 8,5                           |
| Utérus . . . . .     | 11 grossesses : poids 7,0 g | 11,6                 | 4,7       | 12,6    |  | 7,3                  | 2,0       | 12,2    | 50,4 $\pm$ 28,4                          |
| Fibrome . . . . .    | 21                          | 9,7                  | 4,0       | 7,9     |  | 6,6                  | 3,8       | 8,5     | 40,6 $\pm$ 27,2                          |
| Muqueuse utérine.    | 15                          | 1,7                  | 0,6       | 0,8     |  | 0,8                  | 0,2       | 0,3     | 4,4 $\pm$ 2,6                            |
|                      | Phase folliculaire : 18     | 1,5                  | 0,8       | 1,3     |  | 1,2                  | 0,3       | 0,7     | 5,8 $\pm$ 2,5                            |
|                      | Phase lutéale : 24          | 18,5                 | 4,5       | 30,6    |  | 9,0                  | nul       | 13,0    | 75,8 $\pm$ 47,8                          |
|                      |                             | 15,0                 | 3,8       | 107,0   |  | 6,5                  | 1,9       | 17,8    | 152,3 $\pm$ 117,0                        |

Œstrogènes totaux : Muqueuse > corps jaune > ovaire > fibrome > utérus.

*Les corps jaunes*, par contre, gestatifs ou périodiques, *sont beaucoup plus riches en œstrogènes*, avec presque autant d'œstriol que d'œstrone et moins d'œstradiol. Il semble qu'ici la sécrétion soit différente. Il existe en effet des *stéroïdes additionnels* encore non caractérisés, mais peut-être identiques à la 16 $\alpha$ -OH-œstrone ou au 16-céto-œstradiol qui pourraient donner naissance directement dans le corps jaune à de l'œstriol.

*Le muscle utérin normal comme le fibrome sont d'une extrême pauvreté en œstrogènes*. Ils ne contiennent, même au cours de la grossesse, qu'un peu d'œstrone et des traces d'œstriol, l'œstradiol étant souvent indosable.

*L'endomètre par contre contient une quantité considérable d'œstrogènes avec une forte prédominance de l'œstriol* qui, en phase lutéale, atteint 81 % de la totalité des œstrogènes dont 70 % sous forme libre (caractéristique pour Diczfalusy d'une sécrétion tissulaire).

On est tenté de conclure de ces dosages comparatifs que la muqueuse utérine joue un rôle important dans la production de l'œstriol en phase lutéale.

Le problème se pose de savoir de quelle manière se produit cette action. Il peut en effet s'agir :

— soit d'un *stockage sélectif de l'œstriol* au niveau des glandes endométriales, celui-ci étant au préalable produit par d'autres organes tels que *le foie* dont nous avons vu, lors de l'étude du métabolisme intermédiaire des œstrogènes, qu'il était capable de transformer l'œstradiol et l'œstrone en œstriol de façon rapide et importante;

— soit d'une *production in situ d'œstriol dans l'endomètre* à partir de l'œstrone et de l'œstradiol ovariens.

C'est cette dernière hypothèse que nous avons tenté de vérifier par les expériences effectuées récemment *in vitro* : incubation de muqueuse et perfusion d'utérus qui font l'objet du chapitre suivant.

---

### CHAPITRE III

## EXPÉRIENCES EFFECTUÉES *IN VITRO* AVEC DES FRAGMENTS D'ENDOMÈTRE ET UN UTÉRUS ENTIER

### I. — INCUBATION DE TRANCHES DE MUQUEUSE UTÉRINE

En collaboration avec R. Ozon, nous avons effectué cinq expériences d'incubation de tranches minces d'endomètre en présence d'œstradiol pour rechercher une éventuelle hydroxylation en œstriol de cette substance.

**1° Matériel et méthodes.** — *a) Incubation.* — Nous avons incubé des fragments d'endomètre pesant 200 mg environ dans l'heure qui suivait le prélèvement à la curette. Les tranches minces ont été incubées dans 3 ml de solution de Krebs-Ringer-phosphate, tamponnée à pH 7,4, contenant 20 mM de glucose et additionnée de 100 µg d'œstradiol-17β (sauf pour les incubations témoins), dans un bain-marie à 37° pendant 60 minutes en présence d'oxygène.

*b) Extraction et identification.* — Nous avons effectué trois extractions avec le même volume d'éther. Une étude qualitative a été faite dans chaque cas par chromatographie sur couche mince de gel de silice G dans le système A de Lisboa et Diczfalusy (1962) (acétate d'éthyle 45 % - cyclohexane 45 % - éthanol 10 %) et révélation par le réactif de Folin-Ciocalteu. Dans deux cas, nous avons également effectué une chromatographie sur papier Schleicher et Schull 2043 b Mgl dans le système formamide-méthanol (phase stationnaire)-monochlorobenzène (phase mobile) pendant 12 heures et révélation par le réactif de Folin.

Dans trois cas, une *étude quantitative* a été faite par fluorimétrie après séparation et chromatographie de partage sur colonne de célite selon notre technique habituelle.

2° **Résultats** — a) Après incubation d'œstradiol-17 $\beta$  nous avons dans tous les cas pu mettre en évidence après chromatographie, de l'*œstrone* en quantité assez considérable, ce qui confirme la présence dans l'endomètre d'une 17 $\beta$ -ol-déshydrogénase (Villem, 1962).

b) Nous avons également pu déceler, soit visuellement dans les chromatographies en couche mince après révélation au réactif de Folin, soit par mesure fluorimétrique après chromatographie sur colonne, la présence d'un composé ayant le même comportement que l'*œstriol*. Après méthylation et chromatographie sur colonne d'alumine selon Brown (1956) d'échantillons combinés des expériences 1, 4, 5, nous avons retrouvé 84 % de cette substance sous forme d'*œstriol-3-méthyl-éther*.

Le rendement de l'hydroxylation en C<sup>16</sup> est d'environ 2 % et relativement constant quelles que soient les périodes du cycle menstruel où ont été pratiqués les prélèvements. La quantité trouvée est nettement supérieure à celle des incubations témoins sans œstradiol-17 $\beta$ , mais reste cependant dans l'ordre de grandeur des valeurs observées précédemment dans l'endomètre humain, et ne permet pas d'affirmer de façon formelle qu'il s'agit bien d'une hydroxylation de l'œstradiol incubé. Nous avons donc pensé que l'incubation avec de l'*œstradiol-6-7-H<sup>3</sup>* permettrait de trancher ce dilemme de façon formelle. 10 % de la radio-activité récupérée dans la fraction éthéro-soluble a été retrouvée dans la fraction phénolique forte, l'identification de l'*œstriol* ainsi formé est actuellement en cours.

## II. — INCUBATION D'HOMOGÉNATS DE MUQUEUSE UTÉRINE

1° **Matériel et méthode.** — La muqueuse utérine est homogénéisée dans un homogénéisateur Potter-Elvehjem dans une solution de saccharose 0,25 M.

Le broyat cellulaire ainsi obtenu est incubé dans une solution de Krebs-Ringer-phosphate à pH 7,4 à laquelle on ajoute 3 M mol de T.P.N.H. en présence d'oxygène pendant 2 heures.

2° **Résultats.** — a) Dans une expérience effectuée avec une muqueuse utérine prélevée au 18<sup>e</sup> jour du cycle, nous avons fait deux incubations de 2 ml d'homogénat (correspondant à 0,4 gramme de tissu) avec 100  $\mu$ g

d'œstradiol-17 $\beta$ . La chromatographie en couche mince n'a pas révélé de transformation manifeste. Cependant le dosage fluorimétrique après chromatographie sur colonne de célite nous a montré dans chaque milieu d'incubation une très légère transformation en œstrone et en œstriol (1 % environ).

b) Une autre expérience a été effectuée dans les mêmes conditions expérimentales avec 2 grammes de muqueuse utérine prélevée chez 2 malades, l'une au 11<sup>e</sup>, l'autre au 23<sup>e</sup> jour du cycle, avec addition d'œstradiol-17 $\beta$ -6-7-H<sub>3</sub> (1.500.000 d.p.m.).

La moitié environ de la radio-activité a été récupérée dans les extraits éthérés (3 extractions par un volume égal d'éther).

Après séparation entre benzène-éther de pétrole et eau en deux fractions polaires et peu polaires, la quasi-totalité de la radio-activité a été retrouvée dans cette dernière fraction (784.000 d.p.m.).

Après chromatographie fractionnée sur colonne de célite, nous avons pu constater la présence de deux pics de radio-activité distincts correspondant, l'un à l'œstrone (243.000 d.p.m.), l'autre à l'œstradiol (356.000 d.p.m.). La courbe de ces pics étant strictement parallèle à celle de la fluorescence des stéroïdes porteurs ajoutés.

Par contre, la fraction polaire ne contenait que peu de radio-activité (47.600 d.p.m.) et, après chromatographie sur célite, la majeure partie de celle-ci s'est révélée de polarité différente de l'œstriol.

### III. — PERFUSION D'UN UTÉRUS ENTIER

Nous avons eu la possibilité de perfuser avec le docteur Yannotti un utérus pesant 262 grammes prélevé lors d'une hystérectomie subtotale chez une femme porteuse de fibromyomes utérins.

**1<sup>o</sup> Matériel et méthodes.** — 1<sup>o</sup> **Substances radio-actives.** — Œstradiol-17 $\beta$ -6-7-H<sub>3</sub> (The Radio Chemical Center, Amersham, Grande-Bretagne) purifié par chromatographie sur colonne de célite avant l'emploi.

— Œstriol-16-C<sup>14</sup> aimablement fourni par le docteur Levitz (New York) et utilisé sans purification préalable.

2<sup>o</sup> **Les mesures de radio-activité** furent faites très aimablement par M<sup>me</sup> Corpechot dans le laboratoire du professeur agrégé Baulieu avec un spectromètre automatique Tri Carb. Packard à scintillation liquide possédant deux chaînes mesurant simultanément C<sup>14</sup> et H<sub>3</sub>. Les extraits secs ont été dissous dans 5 ml de solution toluénique contenant POPOP et triméthyl-POPOP. Il n'a pas été fait de correction pour le « quenching ».

3° Les trois œstrogènes porteurs, œstrone, œstradiol, œstriol ont été mesurés par fluorimétrie dans l'acide sulfurique à 88 %.

4° **Méthode de perfusion.** — L'utérus transporté dans du sérum physiologique à 37° contenant du chlorhydrate de papavérine a été immédiatement installé dans l'appareil à perfusion en circuit fermé que nous décrivons dans le chapitre suivant (la perfusion de placenta humain *in vitro* appliquée à l'étude de la biosynthèse des œstrogènes), après dissection des deux artères utérines et clampage des tranches de section par des pinces.

Le liquide de perfusion (800 ml de solution de Krebs-Ringer glucosée, tamponnée à pH 7,4) maintenu à 37° par un circuit de réchauffement et oxygéné par un mélange O<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> (95/5) fut additionné de 50 ml de sang ORh+ et propulsé par une pompe à digitation à travers l'utérus pendant 3/4 d'heure, l'issue de liquide par les veines utérines et le réchauffement de l'utérus témoignant de la réalité de la perfusion.

A ce moment nous avons ajouté au liquide de perfusion 7 µC d'œstradiol-17β-6-7-H<sub>3</sub> et, 1 heure 1/2 après, 1,5 µC d'œstriol-4-C<sup>14</sup>, et nous avons laissé la perfusion se poursuivre encore 1 heure (soit 2 heures 1/2 après l'addition d'œstradiol tritié).

5° **Isolement du matériel radio-actif.** — L'évaporation de tous les solvants fut faite par distillation à température inférieure à 60° sous pression réduite et courant d'azote.

a) *Un échantillon du liquide de perfusion* (500 ml) fut extrait par trois fois son volume d'éther fraîchement redistillé et 200 µg d'œstradiol, d'œstrone et d'œstriol ajoutés comme porteurs aux extraits éthers mélangés, après lavage par une solution saturée de bicarbonate de sodium et par de l'eau distillée.

Après évaporation, la fraction contenant l'œstrone et l'œstradiol porteurs fut séparée de l'œstriol par partage entre 80 ml de benzène-éther de pétrole (1/1) et 70 puis 30 ml d'eau distillée réextraite à son tour par 20 ml de solution benzène-éther de pétrole avant addition de 10 ml de tampon phosphaté et extraction par l'éther. Les deux fractions furent chromatographiées sur colonne de célite et la courbe de fluorescence des œstrogènes porteurs fut comparée à celle de la radio-activité.

b) *Un échantillon du muscle utérin* (50 grammes) prélevé en plusieurs points de la pièce opératoire a été broyé au mixer en présence de quartz et d'alcool à 80°, puis le broyat extrait trois fois à l'alcool comme pour le dosage habituel des œstrogènes tissulaires.

Le résidu aqueux après évaporation fut extrait à l'éther et purifié comme précédemment, puis hydrolysé par HCl.

c) *L'endomètre* prélevé par grattage à la curette de la pièce opératoire et pesant 1 gramme a été traité exactement comme le myomètre.

2° **Résultats.** — 1° **Distribution de la radio-activité.** — a) Le tableau XXV indique LA DISTRIBUTION DE LA RADIO-ACTIVITÉ DANS LES DIVERSES FRACTIONS ISOLÉES.

On constate que plus de la moitié du tritium a été retenue dans le muscle utérin au cours de la perfusion, alors que l'œstriol-C<sup>14</sup> est resté en majeure partie dans le liquide de perfusion et que l'endomètre ne contenait pratiquement aucune radio-activité.

TABLEAU XXV. — DISTRIBUTION DE LA RADIO-ACTIVITÉ  
AU COURS D'UNE EXPÉRIENCE DE PERFUSION « IN VITRO » D'UN UTÉRUS.

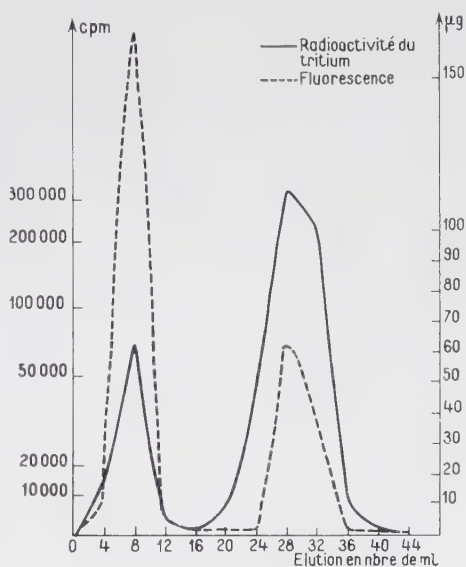
| Précurseurs                                                                                              | Nombre de coups par minute * |                 |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|-----------------|-----|
| Œstradiol-17β-6-7-H3 .....                                                                               | 3                            | 116             | 400 |
| Œstriol-16-C <sup>14</sup> .....                                                                         | 1                            | 348             | 600 |
| I. — LIQUIDE DE PERFUSION (800 ml).                                                                      |                              |                 |     |
|                                                                                                          | H3                           | C <sup>14</sup> |     |
| a) <i>Ethéro-soluble</i> .....                                                                           | 1.455.462                    | 1.093.846       |     |
| fraction phénolique faible (benzène-éther de pétrole) .....                                              | 1.386.350                    | nul             |     |
| fraction phénolique forte (H <sub>2</sub> O) .....                                                       | 65.238                       | 549.408         |     |
| œstrone après chromatographie sur célite .....                                                           | 119.821                      | nul             |     |
| œstradiol après chromatographie sur célite .....                                                         | 928.408                      | nul             |     |
| œstriol après chromatographie sur célite .....                                                           | 55.460                       | 437.965         |     |
| b) <i>Hydrolysable par HCl</i> .....                                                                     | 43.043                       | 30.240          |     |
| II. — MYOMÈTRE ET FIBROME (poids 262,3 grammes).                                                         |                              |                 |     |
| a) <i>Ethéro-soluble par HCl</i> .....                                                                   | 1.669.200                    | 655.200         |     |
| fraction phénolique faible .....                                                                         | 1.445.056                    | nul             |     |
| fraction phénolique forte .....                                                                          | nul                          | 399.000         |     |
| œstrone .....                                                                                            | 37.910                       | nul             |     |
| œstradiol .....                                                                                          | 417.320                      | nul             |     |
| œstriol .....                                                                                            | nul                          | 17.760          |     |
| b) <i>Hydrolysable par HCl</i> .....                                                                     | 15.300                       | 31.200          |     |
| III. — ENDOMÈTRE (poids 1 gramme).                                                                       |                              |                 |     |
| a) <i>Ethéro-soluble</i> .....                                                                           | ± nul                        | ± 400           |     |
| fraction phénolique faible .....                                                                         | nul                          | nul             |     |
| fraction phénolique forte .....                                                                          | 750                          | 500             |     |
| b) <i>Hydrolysable par HCl</i> .....                                                                     | nul                          | 1.000           |     |
| * Après déduction des bruits de fond et de la contamination du tritium par le carbone 14 et inversement. |                              |                 |     |

On peut également constater que la majeure partie de la radio-activité est retrouvée sous forme libre, extractible directement par l'éther dans le

liquide de perfusion, et après précipitation par l'alcool dans le myomètre; l'hydrolyse acide ne libérant que très peu de radio-activité. Le carbone 14 a été évidemment retrouvé exclusivement dans la fraction la plus polaire, une partie notable du tritium du liquide de perfusion étant également dans cette fraction (4,4 %), alors que dans le myomètre tout le tritium était retrouvé dans la fraction peu polaire (œstrone-œstradiol).

b) CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE DE LA FRACTION ŒSTRONE-ŒSTRADIOL. — Dans le liquide de perfusion, 1/10 de la fraction contenant les porteurs œstrone et œstradiol a été chromatographié sur colonne de célite de 5 cm de haut (phase stationnaire NaOH 0,8 N, phase mobile benzène-éther de pétrole,

FIG. 19. — Distribution de la radio-activité et de la fluorescence de la fraction œstrone-œstradiol dans le liquide de perfusion d'un utérus après chromatographie de partage sur colonne de célite.



puis benzène pur). La figure 19 montre la distribution de la radio-activité (H3) et de la fluorescence des œstrogènes porteurs dans les éluats de cette colonne.

On constate qu'il existe deux pics de radio-activité correspondant à l'œstrone et à l'œstradiol (respectivement 119.891 et 928.40 c.p.m.).

— Dans le myomètre, 1/10 de la fraction contenant les porteurs œstrone et œstradiol a été chromatographié sur une colonne de célite, comme précédemment; là aussi nous avons retrouvé deux pics de radio-activité, la radio-activité des fractions œstrone et œstradiol étant respectivement de 37.910 et 417.320 c.p.m.

c) CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE DE LA FRACTION ŒSTRIOL. — La fraction polaire du liquide de perfusion correspondant à l'œstriol porteur, et qui contenait à la fois H3 (65.238 c.p.m.) et C<sup>14</sup> (549.408 c.p.m.), a été étudiée plus particulièrement.

Un échantillon correspondant à 50 ml de liquide de perfusion a été chromatographié sur une colonne de célite de 10 cm de haut (phase stationnaire : alcool méthylique 70 %; phase mobile : dichlorure d'éthylène). La figure 20 montre la distribution de la radio-activité du tritium et de la

fluorescence de l'œstriol porteur dans les éluats de cette colonne. La distribution du  $C^{14}$  étant strictement parallèle à celle de la fluorescence n'a pas été reproduite.

On constate qu'une partie du tritium est retrouvée dans la fraction correspondant à l'œstriol : 55.460 c.p.m., soit 3,8 % de la totalité du tritium présent dans le liquide de perfusion.

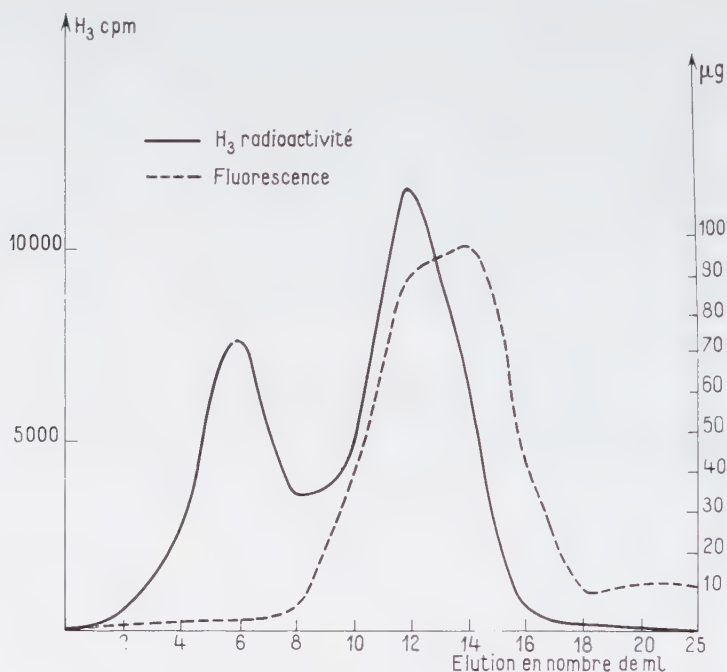


FIG. 20. — Distribution dans une chromatographie de partage sur colonne de célite, de la radioactivité et de la fluorescence de la fraction œstriol du liquide de perfusion d'un utérus, après addition d'œstradiol 17  $\beta$  6-7  $H_3$  et d'œstriol 16  $C^{14}$ .

La courbe correspondant au  $C^{14}$  n'a pas été tracée, elle est strictement parallèle à celle de la fluorescence.

## 2° Purification en série de l'œstriol extrait du liquide de perfusion. —

50 mg d'œstriol ont été ajoutés aux 4/5 de la fraction œstriol du liquide de perfusion, obtenus après chromatographie sur colonne de célite.

L'activité spécifique de cette solution dans l'éthanol a été mesurée pour le tritium et le  $C^{14}$  (respectivement 233.802 et 479.520 d.p.m.). Nous avons ensuite effectué deux cristallisations successives dans le méthanol aqueux et une dans un mélange chloroforme-hexane, et mesuré le rapport  $H_3/C^{14}$  dans les cristaux obtenus et les liqueurs résiduelles à tous les stades.

Le tableau XXVI indique que le rapport  $H_3/C^{14}$  reste relativement constant au cours de ces diverses manipulations (valeur moyenne : 0,64) et

TABLEAU XXIV. — PURIFICATION DE L'ŒSTRIOL DU LIQUIDE DE PERFUSION PAR RECRISTALLISATIONS SUCCESSIVES.

| Stade de purification                       | Nombre de désintégrations par minute * |                 | Quantité de porteur ajoutée | Rapport H3/C <sup>14</sup> |
|---------------------------------------------|----------------------------------------|-----------------|-----------------------------|----------------------------|
|                                             | H3                                     | C <sup>14</sup> |                             |                            |
| <i>Pics de chromatographie sur célite :</i> |                                        |                 |                             | 0,53, 0,49, 0,53           |
| Avant recristallisation ...                 | 233.802                                | 479.520         | 41,00 mg                    | 0,48                       |
| <i>Méthanol aqueux :</i>                    |                                        |                 |                             |                            |
| 1 <sup>ers</sup> cristaux .....             | 4.341                                  | 7.854           | 1,25 mg                     | 0,55                       |
| liqueur résiduelle .....                    | 121.337                                | 133.504         | 12,00 mg                    | 0,90                       |
| 2 <sup>mes</sup> cristaux .....             | 6.991                                  | 9.763           | 1,33 mg                     | 0,71                       |
| liqueur résiduelle .....                    | 44.684                                 | 75.808          | 4,00 mg                     | 0,58                       |
| <i>Chloroforme-hexane :</i>                 |                                        |                 |                             |                            |
| 1 <sup>ers</sup> cristaux .....             | 1.113                                  | 2.113           | 0,30 mg                     | 0,52                       |
| liqueur résiduelle .....                    | 83,7                                   | 112             | 0,06 mg                     | 0,74                       |

\* Ces chiffres représentent le nombre de désintégration par minute après calcul de l'efficacité réelle de l'appareil utilisé (assez variable au cours de la période où nous avons effectué les mesures).

très proche des valeurs obtenues sur le pic du chromatogramme tracé dans la figure 20 (0,53, 0,49, 0,51).

Les critères radiochimiques, nécessaires à l'identification de l'œstriol isolé, nous semblent donc suffisants :

— isolement à partir d'une colonne de célite par chromatographie de partage et élution progressive;

— rapport H3/C<sup>14</sup> identique dans les différents tubes d'éluat, et relativement constant après addition de porteur et trois cristallisations successives, dans les cristaux et les liqueurs résiduelles.

**3° Purification de l'œstrone.** — L'œstrone obtenu dans une de nos expériences (incubation d'un homogénat d'endomètre) a également été soumis à une purification en série :

a) MÉTHYLATION. — Un échantillon correspondant à 1/2 environ de l'extraît étheré a été méthylié puis chromatographié sur une colonne d'alumine selon Brown (1956). La quasi-totalité de la radio-activité récupérée a été retrouvée dans les éluats correspondant à l'œstrone méthyl-éther.

b) CRISTALLISATION. — Les 3/5 restants ont été soumis à deux cristallisations successives dans le méthanol aqueux puis une cristallisation dans

le chloroforme-hexane après addition de 50 mg d'œstrone porteur. L'activité spécifique des cristaux et des liqueurs résiduelles s'est montrée relativement constante.

3° **Discussion.** — Cette expérience de perfusion d'un utérus avec œstradiol-17 $\beta$ -6-7-H<sub>3</sub> et œstriol-4-C<sup>14</sup> nous a permis d'observer un certain nombre de faits :

1° Il existe ainsi que l'avait constaté Jensen et collaborateurs (1962) chez le rat et plus récemment Stone et collaborateurs (1963) chez la souris, *in vivo*, une fixation sélective de l'œstradiol-17 $\beta$  dans le myomètre, et une faible transformation en œstrone (1/10 environ).

Par contre, l'œstriol ne semble pas fixé dans le myomètre, ni même dans l'endomètre, tout au moins dans nos conditions d'expérience.

2° Nous avons cependant pu constater que le liquide de perfusion contenait un plus fort pourcentage d'œstrone radio-actif que le myomètre. En effet le rapport œstrone/œstradiol tritié est de 13 % dans le liquide de perfusion et de 9 % seulement dans le myomètre. Il ne peut s'agir d'une action de la 17 $\beta$ -ol-déshydrogénase des globules rouges contenus dans le liquide de perfusion, car ceux-ci sont fortement hémolysés. Nous avons donc été amenés à attribuer cette transformation à l'endomètre qui nous avait déjà semblé très actif lors de nos expériences d'incubation antérieures.

3° Il semble également que l'endomètre soit doué d'un pouvoir d'hydroxylation sur le carbone 16. En effet, il n'existe aucune trace de tritium dans la fraction œstriol isolée du myomètre, alors qu'il en existe en quantité notable dans le liquide de perfusion. 3,8 % du tritium éthero-soluble sont retrouvés dans la fraction œstriol après chromatographie sur colonne de célite, et le rapport H<sub>3</sub>/C<sup>14</sup> reste pratiquement constant après trois cristallisations successives; ce qui permet d'affirmer la pureté radio-chimique de l'œstriol isolé.

### Conclusion

De cet ensemble d'expériences : incubation de tranches et d'homogénats d'endomètre avec œstradiol stable ou radio-actif, perfusion d'un utérus avec œstradiol-17 $\beta$ -6-7-H<sub>3</sub> et œstriol-4-C<sup>14</sup>, on peut tirer un certain nombre de conclusions :

— Il semble bien que comme chez le rat et la souris, *in vivo*, le myomètre humain est capable de fixer de l'œstradiol en quantités considérables, mais qu'il n'a qu'une faible activité métabolique.

L'endomètre, par contre, est certainement très riche en 17 $\beta$ -ol-déshydrogénase. Il semble, en outre, posséder très probablement une 16 $\alpha$ -hydroxylase, sans que nous ayons pu prouver son existence de façon formelle. On ne peut, en effet, affirmer que l'œstriol, isolé dans nos expériences d'incubation,

est réellement formé à partir de l'œstradiol-17 $\beta$  ajouté, ni que l'œstriol tritié identifié au cours de notre expérience de perfusion a effectivement l'endomètre pour origine.

Nous nous proposons de confirmer ces faits par de nouvelles expériences, et plus particulièrement par des incubations de tranches d'endomètre prélevé à des phases différentes du cycle menstruel, avec de l'œstradiol radio-actif.

— Pour expliquer la teneur exceptionnellement élevée de l'endomètre humain en œstriol, nous avons, en plus de l'hydroxylation directe de l'œstradiol qui nous semble maintenant très probable, émis également l'hypothèse d'un stockage sélectif de l'œstriol d'origine hépatique par exemple. Cette hypothèse nous semble actuellement contredite par deux faits :

1° Dans notre expérience de perfusion, l'endomètre n'a pratiquement pas fixé d'œstriol-16-C<sup>14</sup>.

2° Nous avons tout récemment administré par voie intraveineuse environ 15  $\mu$ curies d'œstradiol-17 $\beta$ -6-7-H<sup>3</sup> à une femme de 34 ans, présentant une malformation utérine, 3 heures 1/4 avant une hystérectomie totale : nous avons retrouvé de l'œstrone et surtout de l'œstradiol tritiés en quantité importante dans le myomètre, alors que l'endomètre ne contenait aucune trace de radio-activité.

---



### TROISIÈME PARTIE

## PERFUSION DE PLACENTA HUMAIN *IN VITRO* APPLIQUÉE A L'ÉTUDE DE LA BIOSYNTHÈSE DES ŒSTROGÈNES

### I. — INTRODUCTION

Halban, il y a plus de 50 ans, avait émis l'hypothèse que le placenta était le siège de productions hormonales, mais l'endocrinologie de cet organe est encore incomplètement connue.

Le rôle prépondérant du placenta n'est cependant plus discuté, les preuves de la production d'œstrogènes dans le placenta humain étant universellement reconnues; nous en rappellerons brièvement quelques-unes :

— Il existe un parallélisme entre l'augmentation du poids du placenta et l'élévation de l'élimination urinaire des œstrogènes au cours de la grossesse, avec retour aux taux normaux post-partum.

— On observe une élimination œstrogénique importante chez les femmes enceintes, atteintes de maladie d'Addison, surrénalectomisées ou castrées, le placenta étant donc capable de suppléer à la disparition fonctionnelle de n'importe quel organe maternel susceptible de fabriquer des hormones.

— Dans les tumeurs d'origine placentaire (môle et chorio-épithéliome), plusieurs auteurs ont noté une augmentation des œstrogènes urinaires, disparaissant après exérèse de la tumeur.

— Enfin Stewart (1951) a, par des implants oculaires de placenta à terme, stimulé l'utérus de la lapine castrée, dont les urines se chargent d'œstrogènes, et on a pu constater une sécrétion d'œstrogènes *in vitro* dans les cultures de tissus placentaires à condition qu'ils possèdent encore un syncytium (Declerck, 1956).

Plusieurs auteurs (Mitchell et Davies, 1954, et Diczfalusy et collaborateurs, 1953, 1956, 1958) ont isolé du placenta frais de nombreux œstrogènes :

|                        |                               |
|------------------------|-------------------------------|
| œstrone,               | 16-épi-œstriol,               |
| œstradiol-17 $\beta$ , | 16-oxo-œstradiol-17 $\beta$ , |
| œstriol,               |                               |

avec prédominance des formes libres, alors que dans les humeurs et les autres tissus maternels et fœtaux les œstrogènes conjugués l'emportent.

Diczfalusy a pu estimer la production journalière du placenta à terme à 50 à 100 mg d'œstrogènes.

On peut localiser cette production dans les éléments syncytiaux, mais l'on ne connaît pas exactement le rôle respectif des éléments maternels et fœtaux. On sait seulement qu'une circulation fœtale adéquate et une bonne connexion fœto-placentaire sont indispensables (Cassmer, 1959).

Les faits expérimentaux ne permettent pas de considérer que le placenta est le lieu de formation de tous les œstrogènes gravidiques. Cet organe peut avoir la propriété de stocker certains œstrogènes d'origine extra-placentaire.

En outre, *le mécanisme exact de la biosynthèse des œstrogènes est encore mystérieux, surtout pour l'œstriol, que sa concentration particulièrement élevée dans les différents organes et humeurs doit faire considérer comme l'œstrogène le plus caractéristique de la gestation humaine.*

En effet, des expériences de perfusion de cotylédon isolé par de l'acétate radio-actif ont pu démontrer la capacité du placenta à synthétiser l'œstrone et l'œstradiol, mais n'ont pu apporter cette preuve en ce qui concerne l'œstriol (Pearlman, 1953; Levitz, Condon et Dancis, 1955). Par ailleurs, Levitz et Dancis (1962) ont récemment signalé qu'ils n'étaient plus parvenus à reproduire leur expérience princeps.

En dehors des travaux de Troën (1959-1961) (perfusions de placenta avec œstradiol radio-actif et gonadotrophines chorioniques) sur lesquelles nous reviendrons tout à l'heure, les seules productions d'œstriol ont été obtenues après incubation de préparation de mitochondries placentaires avec des composés hydroxylés sur le carbone 16 comme l'androstène-3 $\beta$ -16 $\alpha$ -17 $\beta$ -triol (Ryan, 1959 b). On sait d'autre part qu'au cours de la grossesse et par rapport aux œstrogènes totaux, l'excrétion urinaire d'œstriol endogène est très supérieure à celle trouvée après injection d'œstrone marqué (Pearlman et collaborateurs, 1953). En outre, la mesure de l'activité spécifique des métabolites urinaires après administration d'œstradiol radio-actif chez la femme enceinte est en faveur d'un métabolisme de l'œstriol différent de celui de la femme normale (Fishman et collaborateurs, 1962). Il faut évidemment tenir compte du métabolisme fœtal si bien étudié par Diczfalusy depuis quelques années, la concentration de l'œstriol dans les tissus fœtaux étant beaucoup plus élevée que celles de l'œstrone et de l'œstradiol additionnées. Mais les différentes expériences précitées permettent cependant de penser que l'œstriol gravidique pourrait être issu d'une synthèse distincte de celle de l'œstrone et de l'œstradiol.

Il nous a donc semblé que la perfusion *in vitro* du placenta que M. le professeur Varangot avait déjà réalisée en 1949 avec A. Thomas pouvait apporter des renseignements intéressants nous permettant une étude dynamique du métabolisme dans des conditions que nous nous sommes efforcés de rendre le plus physiologiques possible.

En raison de sa disposition anatomique : un pédicule vasculaire unique et facilement accessible, un système circulatoire fœtal anatomiquement clos, le placenta humain est en effet un organe particulièrement propice à la perfusion.

Depuis 1960, nous avons réalisé en collaboration avec le docteur Yannotti un certain nombre de travaux dont nous proposons de faire ici la synthèse.

## II. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

### *Technique de perfusion*

Nous avons utilisé des placentas prélevés avec le maximum d'asepsie, le plus souvent aux environs du terme, dans la demi-heure qui suit leur expulsion accomplie habituellement par les voies naturelles.

Après section des membranes, les vaisseaux funiculaires sont disséqués, les deux artères sont ensuite cathétérisées au moyen d'aiguilles à perfusion à bout olivaire que l'on fixe sur l'artère par une ligature, une pince de Murphy assurant l'étanchéité du montage (fig. 21).

La veine ombilicale est sectionnée et l'on injecte immédiatement de l'héparine dans les artères pour éviter les coagulations intravasculaires. L'appareil employé pour la perfusion est celui du professeur Benard (fig. 22) adapté aux besoins de la perfusion de placenta. Une pompe à digitation fournit aux deux artères ombilicales, sous un débit pulsatile à pression réglable, un litre environ d'une solution de Krebs-Ringer, tamponnée à pH 7,5 après addition de 2 grammes de glucose et d'antibiotiques (1 gramme de streptomycine et 1 million d'unités de pénicilline). On ajoute ensuite au liquide 1/4 de mg de chlorhydrate de papavérine et ultérieurement 1/4 de son volume de sang citraté O Rh—.

Un agitateur rotatif animé par un moteur auxiliaire permet un contact intime entre le liquide de perfusion et un mélange de 95 % O<sub>2</sub> et 5 % CO<sub>2</sub> qui évite la vaso-constriction que produit l'oxygène seul (Panigel et Mayer, 1959).

Un circuit de réchauffement animé par une pompe thermostatique maintient à 37° le liquide de perfusion et le placenta.

Nous nous sommes heurtés au début à un certain nombre de difficultés

dues essentiellement aux coagulations intravasculaires et à la vaso-constriction artérielle. L'injection immédiate d'héparine et l'emploi de sang O Rh d'une part, l'adjonction au liquide de perfusion de chlorhydrate de papa-



FIG. 21. — Cathétérisme des deux artères ombilicales par des aiguilles à point blunts et fixation du montage par une pince de Murphy. On voit le liquide de perfusion qui s'écoule par la veine ombilicale.

verine et le remplacement de l'oxygène pur par un mélange  $O_2$ ,  $CO_2$  d'autre part, nous ont permis de les éviter.

Il existe cependant, tout au moins en début d'expérience, une hyperpression, mais très rapidement (1-2 heure maximum) elle s'atténue, et les

pressions habituellement nécessaires pour obtenir un écoulement suffisant par la veine ombilicale (30 à 50 ml par minute) sont de 25 mm de Hg pour la minima et 30 pour la maxima. Ces pressions ne sont évidemment pas

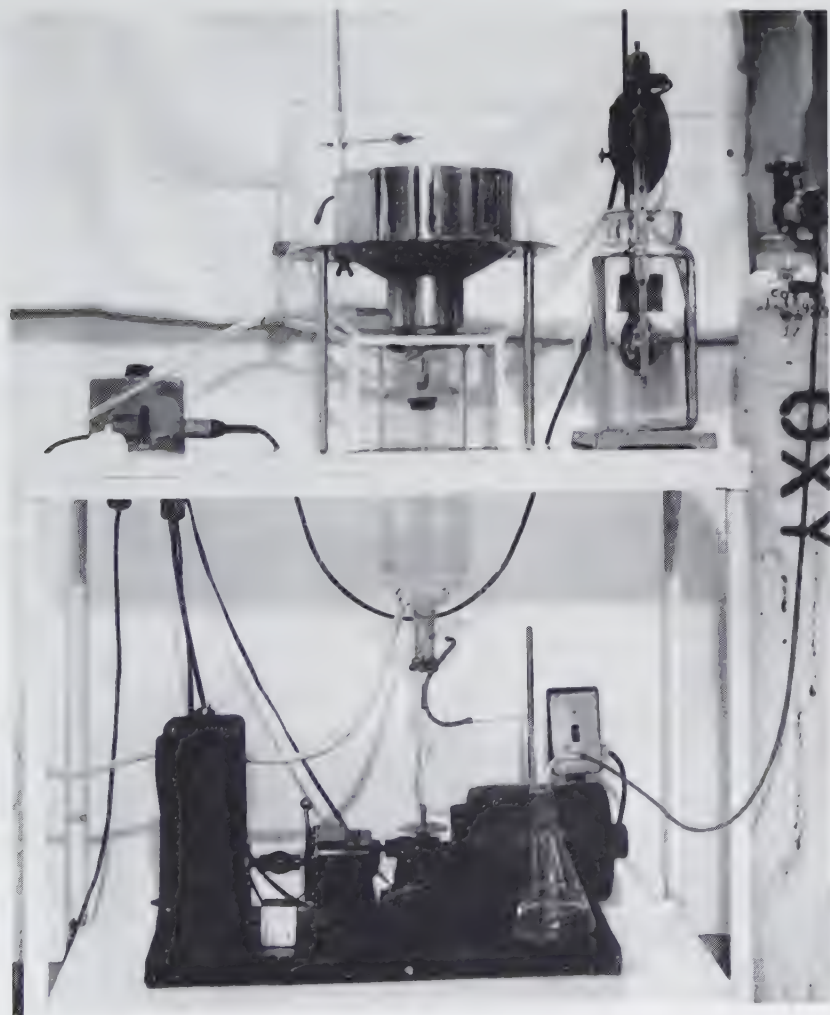


FIG. 22. — Schéma de l'appareil à perfusion (P<sup>r</sup> BENARD).

physiologiques, mais ce fait ne nous a pas semblé avoir beaucoup d'importance pour des études métaboliques.

Il existe en outre un léger œdème en début d'expérience qui cède le plus souvent dès l'addition de sang.

*Nous avons, avec cet ensemble de précautions, pu réaliser 101 perfusions*

de la partie fœtale du placenta pendant un temps suffisamment long (4 à 6 heures) pour réaliser une étude dynamique du métabolisme des œstrogènes. Quatre-vingt-seize expériences correspondent à des placentas à terme.

La réalité de la perfusion dans le circuit fœtal nous semble amplement démontrée.

Dès le début de l'expérience, le liquide s'échappe par la veine ombilicale, parfois en jet, tandis que les artères visibles sous l'amnios deviennent turgescentes et pulsatiles.

Nous ne pensons pas que la rapidité du retour veineux soit due uniquement à la présence d'anastomoses artério-veineuses en surface, ce qui traduirait une perfusion incomplète. En effet, après addition au liquide de perfusion de colorants (bleu de Prusse, vert de méthyle), on retrouve ces substances à l'examen histologique dans les vaisseaux des villosités.

### *Méthodes de dosage et vérifications techniques*

Parmi les trois œstrogènes actuellement isolés du tissu placentaire, nous avons étudié plus particulièrement l'œstrone, l'œstradiol-17 $\beta$  et l'œstriol, sous leurs deux formes : libres (ou extractibles directement par l'éther) et hydrolysables par HCl à chaud. Cette dernière fraction correspond aux œstrogènes conjugués ou liés aux protéines non dénaturées par l'éther ainsi qu'aux stéroïdes polyhydroxylés non éthérosolubles.

Les dosages sont effectués par fluorimétrie après chromatographie de partage sur célite, exactement comme pour les œstrogènes sanguins, l'hydrolyse acide étant simplement précédée d'une extraction par l'éther des œstrogènes libres. Ces mesures sont effectuées sur des échantillons de 25 ou 50 ml de liquide de perfusion, prélevés à intervalles réguliers au cours des diverses expériences.

Les quantités d'œstrogènes calculées par comparaison avec des courbes d'étalonnage sont rapportées ensuite au volume total du liquide de perfusion.

La méthode de dosage des œstrogènes sanguins a déjà été soumise au contrôle des critères actuels (Borth, 1952) de précision, de sensibilité, d'exactitude et de spécificité. Nous avons cependant préféré faire quelques vérifications techniques dans le cas particulier du liquide de perfusion.

**1° Précision.** — La mesure de la précision de la technique a été calculée par la méthode de Snedecor dans laquelle on estime  $s = \sqrt{\frac{\sum d^2}{2 N}}$  d'après la différence entre les résultats de mesures en double dans une série de dosages avec  $d$  = la différence entre les deux résultats dans la mesure en double et  $N$  = le nombre de dosages en double effectués.

a) Pour des valeurs comprises entre 0,5  $\mu\text{g}$  et 55  $\mu\text{g}$  (expérience sans addition d'hormones) :

|                        |                        |
|------------------------|------------------------|
| œstrone (10 dosages)   | $s = 0,28 \mu\text{g}$ |
| œstradiol (10 dosages) | $s = 0,39 \mu\text{g}$ |
| œstriol (11 dosages)   | $s = 0,85 \mu\text{g}$ |

b) Pour des valeurs beaucoup plus élevées comprises entre 100 et 1.400  $\mu\text{g}$  (c'est-à-dire après addition d'hormones), la précision est évidemment plus faible :

|                       |                        |
|-----------------------|------------------------|
| œstrone (3 dosages)   | $s = 4,4 \mu\text{g}$  |
| œstradiol (4 dosages) | $s = 10,3 \mu\text{g}$ |
| œstriol (4 dosages)   | $s = 11,3 \mu\text{g}$ |

2° **La sensibilité** de la méthode n'a pas fait l'objet d'études spéciales puisque nous avons employé la même technique que précédemment pour le sang humain et que les quantités en présence étaient assez importantes, sauf pour l'œstrone et l'œstradiol conjugués.

3° **Exactitude.** — L'exactitude a été mesurée par l'utilisation d'un standard interne, c'est-à-dire la récupération d'hormones pures ajoutées à l'échantillon. Comme précédemment pour le sang total, les récupérations sont assez faibles. Après addition de 5 ou 10  $\mu\text{g}$  d'hormone pure au début du dosage le pourcentage moyen de récupération est :

|                  |                                  |
|------------------|----------------------------------|
| pour l'œstrone   | $50 \pm 23 \%$ ( 8 expériences)  |
| pour l'œstradiol | $49 \pm 16 \%$ ( 8 expériences)  |
| pour l'œstriol   | $69 \pm 14 \%$ (10 expériences). |

4° **Spécificité.** — a) Les substances mesurées ont le même *comportement chromatographique* que les œstrogènes purs.

b) Les *maxima d'excitation et d'émission de fluorescence* sont identiques, respectivement 455 et 480 à 490  $\text{m}\mu$  pour les hormones pures et les extraits.

c) Les extraits chromatographiés réagissent *avec les réactifs de Brown* et les spectres d'absorption des réactions présentent les même maxima que ceux des hormones pures correspondantes.

d) L'œstriol isolé du liquide de perfusion réagit avec le réactif de David (1934) (modif. Axelson et Diczfalusy, 1961) en donnant une coloration bleue de même longueur d'onde maxima que l'hormone standard.

e) R. Ozon a bien voulu réaliser pour nous la *microsublimation* de l'œstrone et de l'œstriol sur lamelle de verre selon la technique de Breuer et Kassau (1960) dans une cuve de pyrex (diamètre 16 mm, hauteur 10 mm) adaptée sur une plaque chauffante Reichert. Il a pu pour l'œstrone et l'œstriol observer la formation de micro-cristaux caractéristiques et mesurer

ensuite les points de fusion qui se sont révélés très voisins de ceux des hormones standards (fig. 23).

|                                       | Extrait    | Hormone pure |
|---------------------------------------|------------|--------------|
| <i>Œstriol</i>                        |            |              |
| Température de microsublimation ..... | 160 à 250° | 180 à 240°   |
| Point de fusion .....                 | 275°       | 280°         |
| <i>Œstrone</i>                        |            |              |
| Température de microsublimation ..... | 150 à 200° | 150 à 200°   |
| Point de fusion .....                 | 246 - 248° | 246 - 250°   |

f) Nous avons également effectué des *chromatographies* sur papier :

α) Œstrone et œstradiol-17β dans le système de Kushinski (1960) : Benzène-Heptane/Méthanol-Eau; chromatographie effectuée pendant 4 heures  
(2      1            1,5      1,5)

sur papier Whatman n° 1 à la température ambiante. Nous avons trouvé

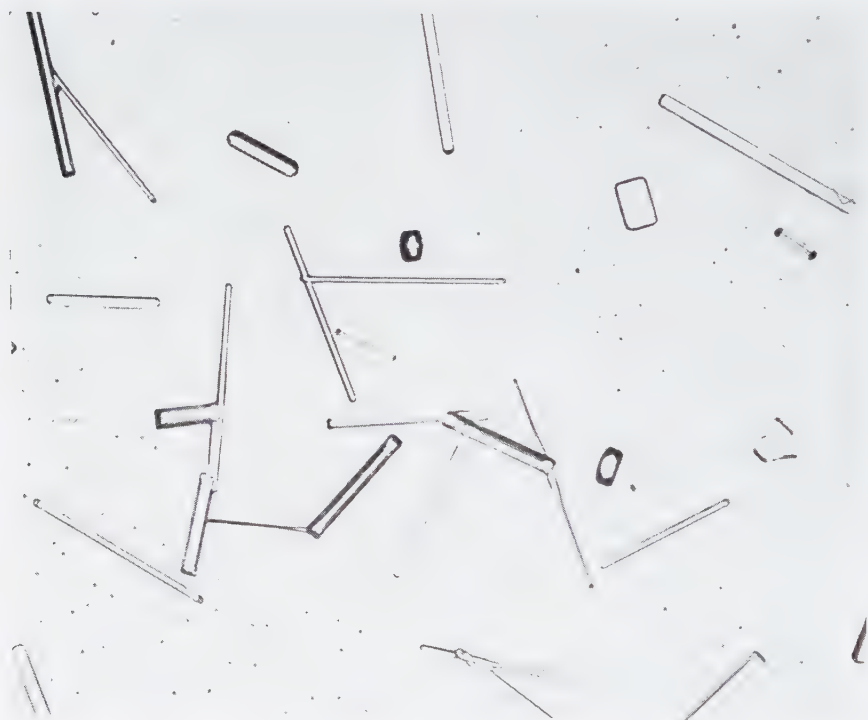


FIG. 23. — Microcristaux d'œstrone obtenus par microsublimation selon la technique de BREUER et KASSAU (1960) à partir du liquide de perfusion placentaire (aromatisation de la  $\Delta^4$  androstène 3-17 dione).

des rfs identiques pour les hormones pures et les extraits, et des réactions de Barton positives (rf œstrone = 1 par définition; rf de l'œstradiol = 0,6 à 0,7).

β) La fraction correspondant à l'œstriol fut chromatographiée dans un système de Bush : Benzène/Méthanol-Eau; chromatographie effectuée pendant 36 heures sur papier Whatman n° 20. Là aussi nous avons constaté

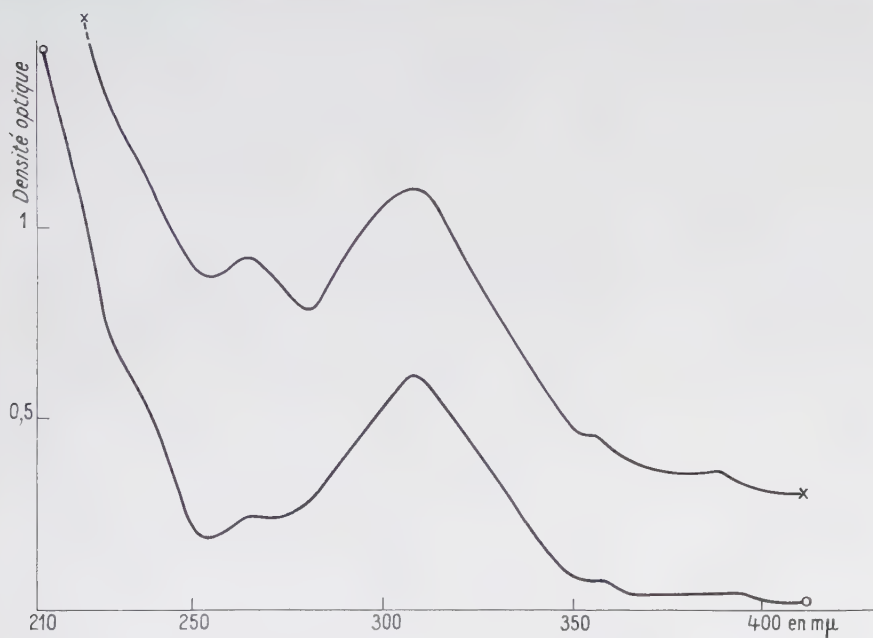


FIG. 24. - Spectre d'absorption en lumière ultraviolette.

x—x Extrait d'un liquide de perfusion placentaire correspondant à 6  $\mu$ g d'œstriol dans 0,4 ml  $\text{SO}_4\text{H}_2$ .

o—o 5  $\mu$ g d'œstriol (hormone pure) dans 0,4 ml  $\text{SO}_4\text{H}_2$ .

un rf identique à celui de l'hormone pure (le rf est peu différent de 0,05), et une réaction de Barton positive. Cette chromatographie fut faite soit directement, soit après élution préalable de la zone de départ d'un chromatogramme dans le système Benzène-Heptane/Méthanol-Eau.

g) Nous avons étudié les spectres d'absorption en lumière ultraviolette (Unicam SP 500) des trois fractions œstrogéniques purifiées, après un séjour de 2 heures à l'obscurité en présence d'acide sulfurique concentré (micro-méthode d'après Burnstein et Leenhardt) et nous avons constaté l'existence pour ces trois fractions de longueurs d'onde maxima et minima identiques à celles des hormones pures, en dépit de quelques différences quantitatives (fig. 24).

h) De même l'étude des *spectres infrarouges* que le professeur agrégé Weinmann a eu l'obligeance d'effectuer pour nous, a montré l'existence certaine dans nos extraits d'œstrone, d'œstradiol et d'œstriol. Cependant la présence de quelques pics supplémentaires et la faible amplitude de quelques maxima caractéristiques ne nous permettent pas de conclure à la pureté absolue de nos extraits biologiques, même après deux chromatographies de partage successives.

### III. — RÉSULTATS

#### *Libération d'œstrogènes dans le liquide de perfusion*

1° Nous avons systématiquement dans toutes nos expériences effectué des dosages dans le liquide de perfusion prélevé 1 heure après le début

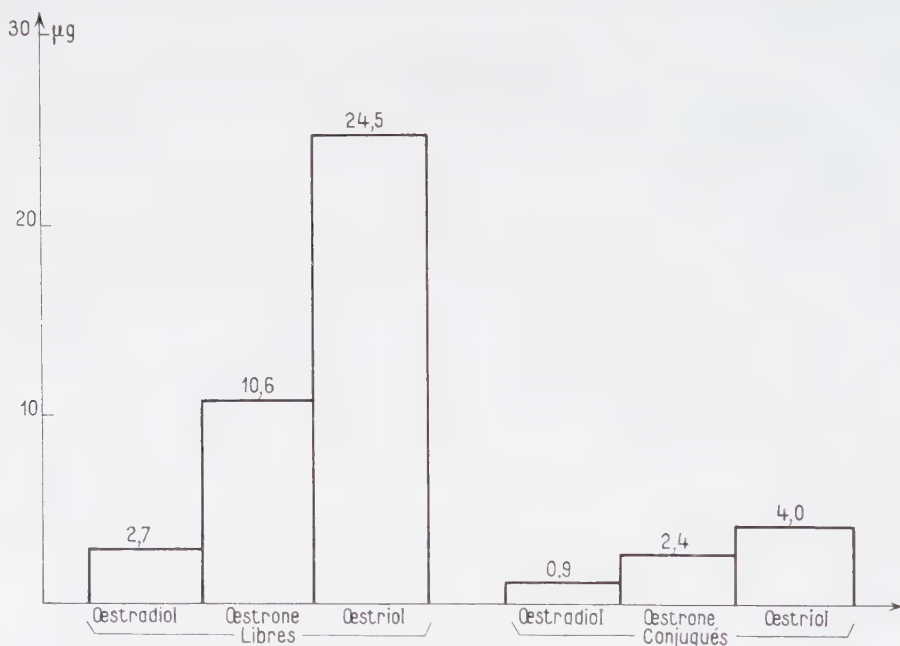


FIG. 25. — Œstrogènes retrouvés dans le liquide de perfusion, une heure après le début de l'expérience (moyenne de 81 perfusions).

de l'expérience. Nous avons constaté dans celui-ci la présence d'œstrogènes en quantités notables avec, comme le montre la figure 25, une prédominance des œstrogènes libres sur les conjugués, et de l'œstriol sur l'œstrone et surtout sur l'œstradiol.

En effet, la valeur globale moyenne de 80 expériences (45,1  $\mu\text{g}$ ) se répartit ainsi :

|                 |      |
|-----------------|------|
| Œstrone .....   | 28 % |
| Œstradiol ..... | 8 %  |
| Œstriol .....   | 64 % |

Ces proportions sont en accord avec les valeurs obtenues dans les tissus placentaires (Mitchell et Davies, 1954; Diczfalusy et Lindkvist, 1956; Diczfalusy et Halla, 1958; Schmidt-Elmendorff, 1961).

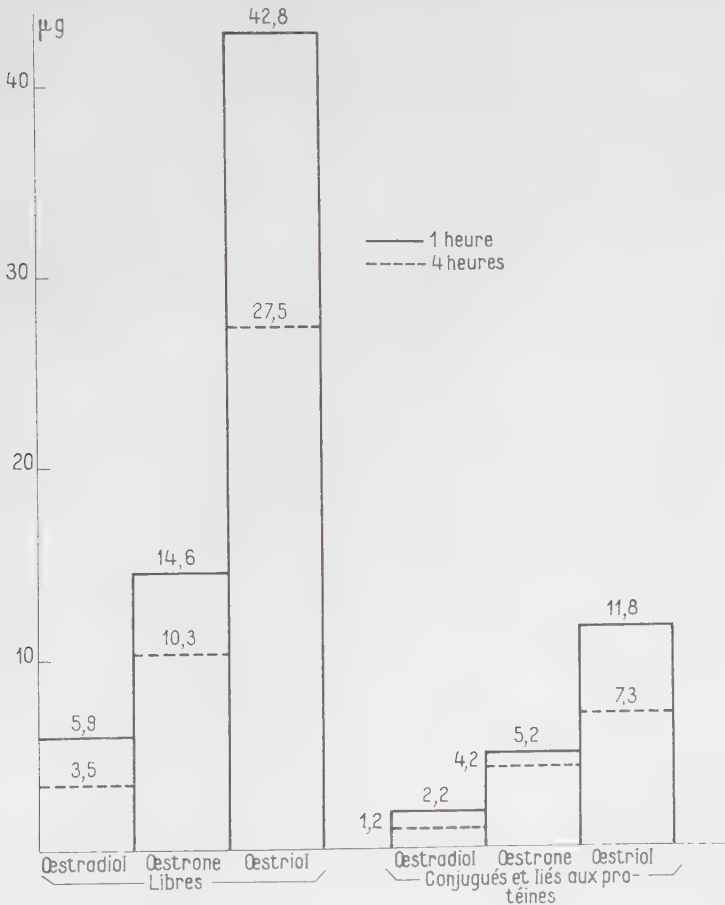


FIG. 26. — *Perfusions de placentas sans addition d'hormones* (moyenne de 6 expériences).

Nous avons cependant pu observer des écarts individuels importants et constater qu'ils étaient sans rapport avec le poids du placenta.

Aussi avons-nous décidé d'effectuer pour chaque expérience un dosage

de base après une heure de perfusion et de le déduire des résultats ultérieurs, afin d'éliminer le plus possible les facteurs individuels.

2° Nous avons effectué 6 perfusions de placentas à terme sans adjonction d'hormones (fig. 26) et comparé les résultats obtenus en début et en fin d'expérience (4 heures).

L'augmentation des diverses fractions que l'on retrouve individuellement dans cinq cas sur six a pu être vérifiée statistiquement, comme le montre le tableau suivant :

| ŒSTROGÈNES LIBRES                          |                                                                   |                                                |                                                      |
|--------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
|                                            | <i>Augmentation<br/>moyenne<br/>Moyenne <math>\pm</math> S.D.</i> | <i>t = variable<br/>réduite<br/>de Student</i> | <i>p = probabilité<br/>de l'hypothèse<br/>hasard</i> |
| Œstrone .....                              | 4,3 $\pm$ 3,0                                                     | $t = 2,7$                                      | $p = 0,02$                                           |
| Œstradiol .....                            | 2,4 $\pm$ 1,2                                                     | $t = 3$                                        | $0,01 < p < 0,02$                                    |
| Œstriol .....                              | 15,3 $\pm$ 7,2                                                    | $t = 4,2$                                      | $0,001 < p < 0,01$                                   |
| ŒSTROGÈNES CONJUGUÉS ET LIÉS AUX PROTÉINES |                                                                   |                                                |                                                      |
| Œstrone .....                              | 1,0 $\pm$ 0,4                                                     | $t = 0,6$                                      | $p = 0,1$                                            |
| Œstradiol .....                            | 1,0 $\pm$ 0,5                                                     | $t = 2,3$                                      | $0,02 < p < 0,05$                                    |
| Œstriol .....                              | 4,5 $\pm$ 2,0                                                     | $t = 2,2$                                      | $p = 0,02$                                           |

L'augmentation des trois fractions est donc significative pour les trois hormones libres et pour l'œstriol conjugué. Signalons que l'œstrone et l'œstradiol conjugués qui n'augmentent qu'à peine ne sont pas retrouvés dans le placenta frais par la plupart des auteurs.

On peut par conséquent conclure de ces six expériences que le placenta est capable de sécréter ou de libérer pendant la perfusion une quantité d'œstrogènes supérieure à celle qui est détruite au cours de l'expérience à l'intérieur du système, et constituée pour au moins 60 % par de l'œstriol libre.

### Interconversion des œstrogènes

Le placenta est également capable de transformer les œstrogènes qu'on lui fournit :

1° Nous avons tout d'abord pu reproduire le mécanisme d'**interconversion de l'œstrone et de l'œstradiol**, qui a déjà été démontré par Ryan et Engel (1953 b) avec des tranches de tissu placentaire, par Levitz et collaborateurs (1956 a) dans des cotylédons perfusés et plus récemment par Troën sur des placentas entiers *in vitro* (1959-1961) et par Bolté et collaborateurs (1964 a) lors des perfusions *in situ*.

Au cours de sept expériences, nous avons ajouté de l'œstrone et de l'œstradiol (20 mg dans 5 cas; 10 mg dans 2 cas) au liquide de perfusion après un prélèvement initial effectué à la fin de la première heure (fig. 27).

Trois heures après, c'est-à-dire 4 heures après le début de l'expérience,

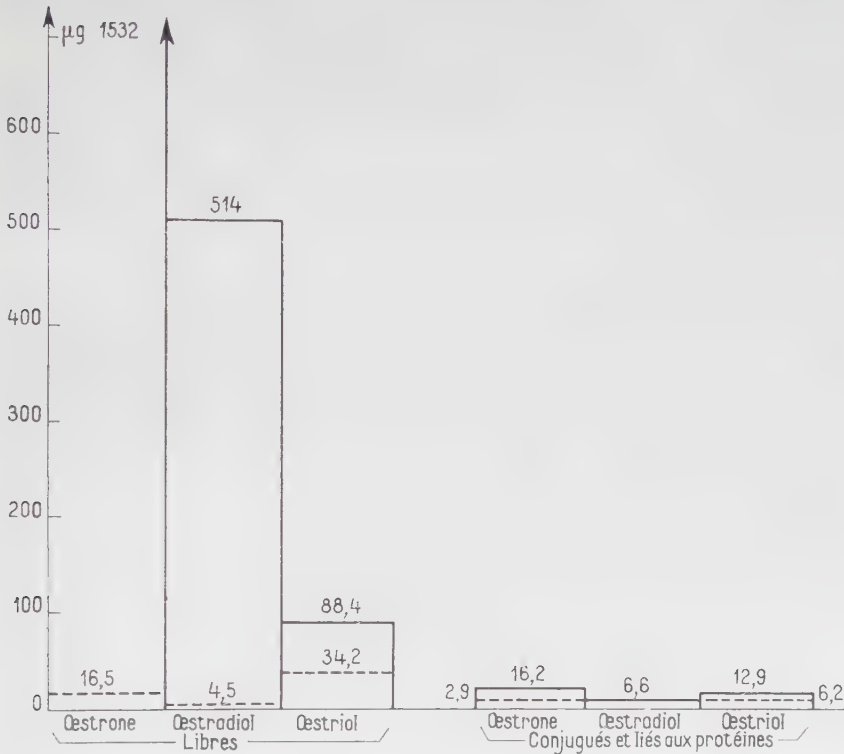


FIG. 27. — Perfusions avec addition d'hormone pure : œstradiol 17  $\beta$  (10 ou 20 mg).

----- 1 heure de perfusion.

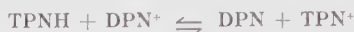
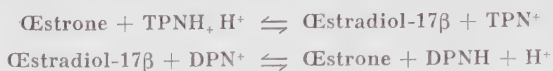
————— 4 heures de perfusion.

on constate une augmentation considérable de l'œstradiol, et surtout de l'œstrone, alors que l'œstriol augmente beaucoup plus modérément.

Les résultats sont identiques, que l'on ajoute de l'œstrone ou de l'œstradiol, ce qui prouve qu'à l'intérieur du système l'œstradiol se transforme en œstrone et inversement.

Cette interconversion est due à la 17 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase placentaire qui a fait l'objet des travaux de Langer et Engel (1958), Talalay et Williams-Ashman (1958-1962) et de Villee (1953-1962), et se fait grâce au

mécanisme suivant, incluant des stéroïdes et des pyridines nucléotides comme transporteurs d'hydrogène :



*Il s'agit donc d'une transhydrogénation* qui, comme l'a établi Villee (1960), est en rapport avec le métabolisme oxydatif. Les mécanismes exacts sont encore hypothétiques et on ne sait pas encore s'il s'agit réellement d'une transhydrogénase (Jarabak et collaborateurs, 1962) ou de deux œstradiol-17 $\beta$ -déshydrogénases, l'une fonctionnant avec le D.P.N., l'autre avec le T.P.N. (Villee, 1962).

Les travaux de Villee et collaborateurs ont montré depuis longtemps que les homogénats de placenta humain ont un métabolisme augmenté quand on leur ajoute de petites quantités d'œstrogènes (1953) et que cette stimulation est due à une D.P.N. isocitrique déshydrogénase (1955) couplée à l'enzyme sensible aux œstrogènes. Cette stimulation par l'œstradiol a une importance considérable; augmentant l'énergie biologique utilisable, elle accroît la synthèse des protéines, des acides nucléiques et des graisses, réactions indispensables à la croissance.

L'enzyme sensible aux œstrogènes isolé du placenta a d'ailleurs pu être utilisé par Gordon et Villee (1956) comme un test biologique *in vitro* des œstrogènes et a permis de comparer les activités œstrogéniques et anti-œstrogéniques de nombreux corps stéroïdes.

*Cette interconversion de l'œstrone et de l'œstradiol se fait toujours en faveur de l'œstrone dont la concentration dans les milieux de perfusion est en moyenne trois fois supérieure à celle de l'œstradiol :*

74 % œstrone  
21 % œstradiol  
5 % œstriol

avec une récupération globale moyenne égale à 12 % de la quantité ajoutée.

De même, après addition d'œstradiol-17 $\beta$ -<sup>14</sup>C au liquide de perfusion de placenta entier, Troën (1959-1961) récupère 15 à 20 % de la radio-activité sous forme d'œstradiol et 80 à 85 % sous forme d'œstrone.

*Nous avons pu constater que cette interconversion était bien due au placenta en survie et non à des enzymes contenus dans le sang utilisé pour la perfusion, car elle n'existe pas dans les deux expériences témoins effectuées sans placenta.*

L'augmentation de l'œstriol y est pratiquement nulle et 1/10 seulement de l'œstradiol est converti en œstrone, le rapport œstrone/œstradiol étant très différent de celui observé habituellement (0,1 au lieu de 3).

2° L'addition de 10 mg d'œstriol ne produit qu'une augmentation de l'œstriol. La différence entre les dosages effectués 1 heure et 4 heures après le début de l'expérience est de :

|                 | Libres  | Conjugués |
|-----------------|---------|-----------|
| Œstrone .....   | 19,1 µg | 4,1 µg    |
| Œstradiol ..... | 5,2 µg  | 1,2 µg    |
| Œstriol .....   | 596 µg  | 42,4 µg   |

L'augmentation est donc constituée pour 95 % par de l'œstriol qui se comporte bien comme le produit terminal du métabolisme des œstrogènes.

3° Le placenta est en outre capable de sécréter (ou de libérer) dans le milieu de l'œstriol. — La figure 31 rapporte les quantités d'œstriol libérées dans le milieu au cours de différents types d'expériences.

On voit que le taux d'œstriol libéré dans le liquide de perfusion après addition de 20 mg d'œstrone ou d'œstradiol (4 expériences) est le double de celui que l'on observe dans les perfusions de placenta seul. Le calcul statistique montre que la différence entre ces deux augmentations moyennes, respectivement  $47,9 \pm 14,5$  µg et  $19,9 \pm 8,8$  µg, est significative ( $p =$  probabilité de l'hypothèse hasard = 0,05).

De plus, après addition de 20.000 unités de gonadotrophines chorioniques en sus de l'œstradiol, l'œstriol est libéré en quantité beaucoup plus considérable encore, l'augmentation moyenne au cours de trois expériences étant de  $93,5 \pm 17,8$  µg.

Le calcul statistique montre ici une différence très significative entre ces expériences et les témoins sans addition d'hormones pures ( $p =$  probabilité de l'hypothèse hasard)  $0,01 < p < 0,05$ .

L'addition de gonadotrophines chorioniques semble donc favoriser la synthèse de l'œstriol.

Nos résultats sont en parfaite concordance avec ceux de Troën (1961) qui, après addition de H.C.G. et d'œstradiol au liquide de perfusion, trouve un pic de radio-activité et de fluorescence après séparation à contre-courant, de coefficient de partage identique au coefficient théorique de l'œstriol, sans qu'il ait pu identifier formellement d'ailleurs cette substance.

Les pourcentages des différentes hormones (15 à 35 % pour l'œstradiol; 65 à 80 % pour l'œstrone; 1 à 5 % pour le 3<sup>e</sup> métabolite) sont en excellent accord avec les nôtres (œstradiol : 20 à 25 %; œstrone : 66 à 71 %; œstriol : 4 à 10 %).

L'addition de gonadotrophines chorioniques (20.000 unités) seule, n'a par ailleurs pas entraîné de modifications des œstrogènes libérés au cours de la perfusion; l'augmentation globale entre la première et la quatrième heure a été dans un cas de 26,8 µg se répartissant ainsi : œstrone : 25 %; œstradiol : 20 %; œstriol : 55 %.

L'addition de 20 mg de progestérone en sus de l'œstradiol n'a pas semblé avoir de l'influence sur la transformation de l'œstriol, l'augmentation de

cette substance entre la première et la quatrième heure n'a été que de 36,7  $\mu$ g.

Nous avons donc pu, par addition d'œstradiol seul ou associé aux gonadotrophines chorioniques, stimuler la sécrétion de l'œstriol par le placenta perfusé. Mais le pourcentage d'œstriol ainsi libéré reste minime, par rapport à celui que l'on observe à la 4<sup>e</sup> heure d'une perfusion témoin sans hormone (moyenne 5 % au lieu de 66 %).

Bolté et collaborateurs (1964 a) n'ont d'ailleurs retrouvé aucune hydroxylation en C<sup>16</sup> dans les placentas de 17 à 20 semaines perfusés *in situ* pendant quelques minutes avec de l'œstradiol.

### ***Biosynthèse de l'œstriol à partir de stéroïdes hydroxylés sur le carbone 16***

Les expériences que nous venons de résumer nous ont donc confirmé dans l'opinion que la voie classique de production de l'œstriol par hydroxylation en C<sup>16</sup> de l'œstradiol n'a qu'une importance limitée dans le placenta humain.

Nous avons été ainsi conduits à étudier une deuxième voie métabolique qui exclut l'œstradiol et où l'œstriol est sécrété directement par le placenta à partir d'androgènes hydroxylés au préalable sur le carbone 16.

La transformation des stéroïdes androgènes à 19 atomes de carbone en œstrogènes à 18 atomes de carbone est un phénomène complexe sur lequel nous reviendrons dans le prochain chapitre et où interviennent déméthylation, déshydrogénation et hydroxylation du noyau A.

Depuis les travaux de Ryan (1959 b) on pense que dans le placenta l'hydroxylation sur le carbone 16 des androgènes précède leur aromatisation. Cet auteur a en effet démontré que les préparations de microsomes placentaires humains étaient capables de convertir certains stéroïdes neutres hydroxylés en C<sup>16</sup>, tel que le triol d'Hirschmann (androst-5-ène-3 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol), directement en œstriol et ceci avec un rendement de 27 % environ. La 16 $\alpha$ -OH-œstrone jouerait le rôle d'intermédiaire entre la 16 $\alpha$ -OH-androstènedione et l'œstriol, alors que le 16 $\alpha$ -OH-testostérone donnerait directement naissance à ce dernier (fig. 28).

Le rôle intermédiaire de la 16 $\alpha$ -OH-œstrone se conçoit aisément si l'on sait que cette substance ainsi que d'autres œstrogènes hydroxylés sur le carbone 16 ont été isolés en quantités importantes par Marrian et ses élèves dans les urines de femmes enceintes.

1° Nous avons pu, au cours de 4 expériences, constater que l'adjonction de 20 mg d'acétate de 16 $\alpha$ -OH-œstrone entraîne, trois heures après, une augmentation moyenne de 1,400  $\mu$ g des œstrogènes recueillis dans le liquide de perfusion, augmentation constituée pour 99 % par de l'œstriol libre

(fig. 29). Une étude plus prolongée, et effectuée avec 10 mg de 16 $\alpha$ -OH-œstrone seulement, nous a montré que cette transformation est progressive et n'atteint son maximum que 4 heures après l'addition de la substance.

L'expérience témoin effectuée sans placenta n'a pas produit d'œstriol.

2° Nous avons également pu obtenir, au cours de 4 expériences, la transformation de la 16 $\alpha$ -OH-androstènedione et de la 16 $\alpha$ -OH-testostérone en œstriol en quantités importantes.

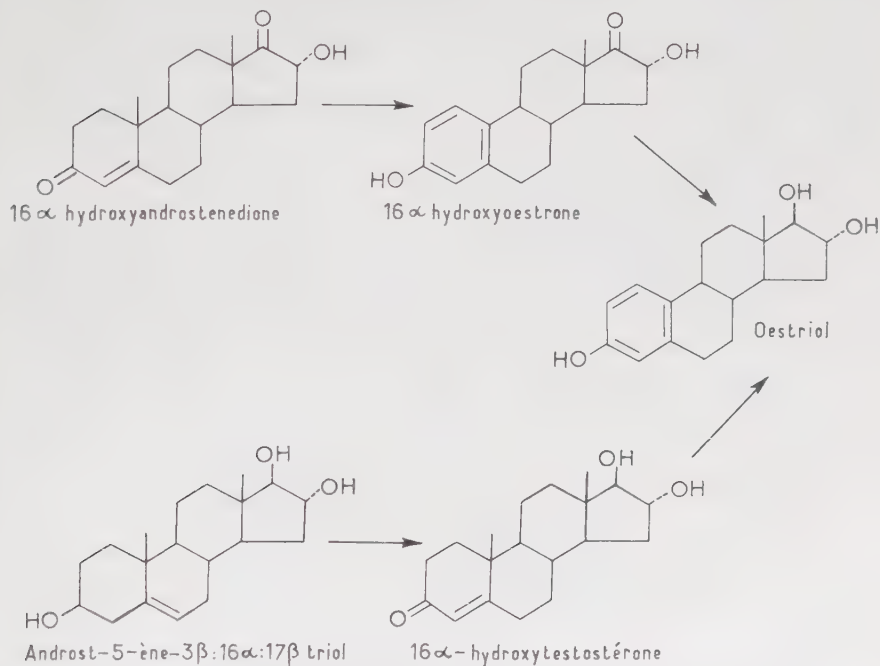


FIG. 28. — Biosynthèse de l'œstriol (RYAN, 1959 b) par les microsomes placentaires in vitro.

Après addition de 10 mg de l'une de ces substances et à condition d'ajouter simultanément 20.000 U.I. de gonadotrophines chorioniques, nous avons constaté une augmentation progressive de l'œstriol dans le liquide de perfusion, atteignant jusqu'à 500  $\mu$ g 5 ou 6 heures après l'adjonction des hormones (fig. 30).

Le rendement identique des deux produits n'est pas pour nous surprendre, étant donné la présence d'une 17 $\beta$ -hydroxystéroïde-déshydrogénase placentaire capable de transformer aussi bien la testostérone en  $\Delta$ 4-androstène-3-17-dione que, comme nous l'avons vu, l'œstradiol en œstrone (Jaraback et collaborateurs, 1962).

Nous soulignerons la nécessité pour la réussite de ces expériences de

*l'adjonction simultanée de gonadotrophines chorioniques.* En effet, les expériences effectuées avec addition d'un stéroïde neutre hydroxylé sur le carbone 16 seulement furent négatives, l'œstriol n'ayant subi entre 1 heure et 4 ou 5 heures d'expériences que la légère augmentation (15  $\mu\text{g}$ ) habituelle lors des perfusions de placenta sans addition d'hormones.

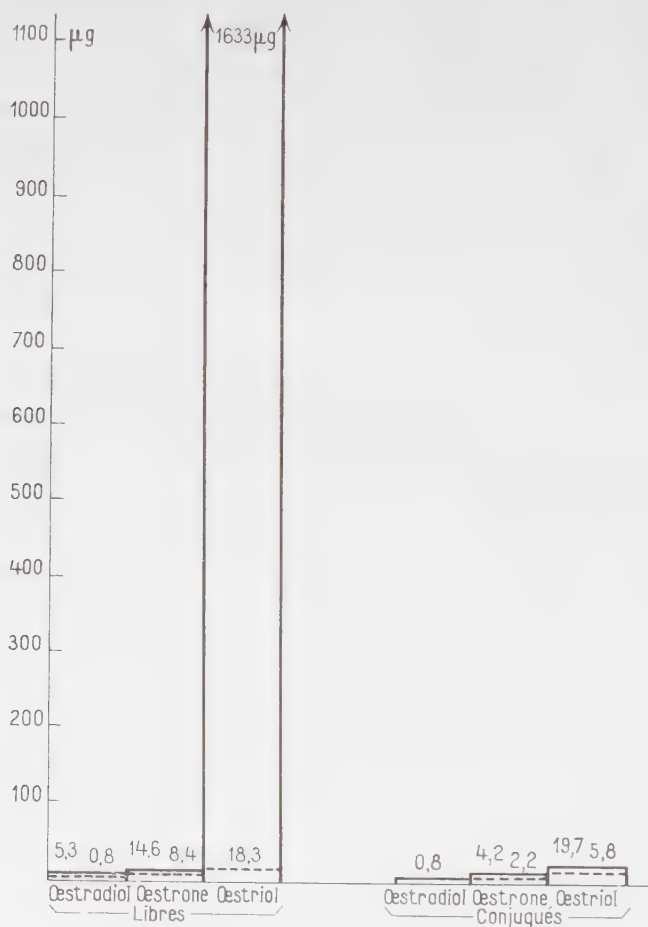


FIG. 29. — *Perfusion de placenta avec addition de 16  $\alpha$ -hydroxy-œstrone.*  
 ---- 1 heure de perfusion.  
 ——— 4 heures de perfusion.

3° La figure 31 résume les résultats obtenus au cours des différents types d'expériences. Elle indique en effet l'augmentation moyenne de l'œstriol libre dans le milieu de perfusion, cette valeur étant obtenue par soustraction des quantités trouvées à la fin de la première heure de perfusion pour éliminer les écarts dus au contenu propre de chaque placenta.

Cette augmentation assez modérée sans addition d'hormones (19,9  $\mu\text{g}$ ) est beaucoup plus considérable comme nous l'avons vu après adjonction de 20 mg d'œstrone ou d'œstradiol-17 $\beta$  (47,9  $\mu\text{g}$ ), surtout si l'on ajoute simulta-

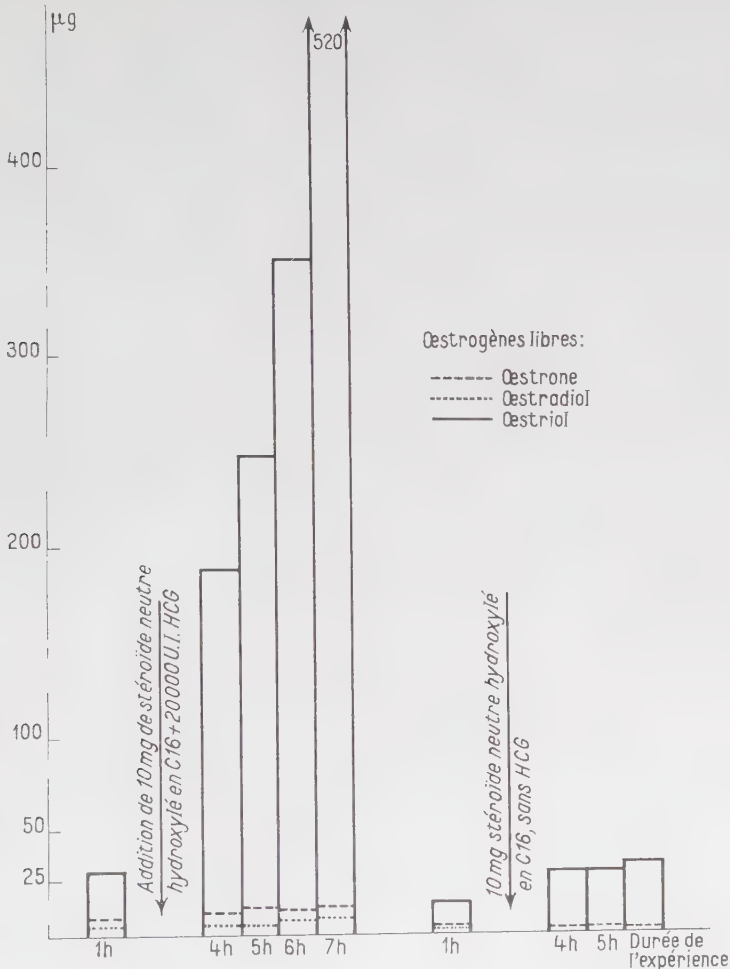


FIG. 30. — Perfusion de placenta avec addition de 10 mg de 16  $\alpha$ -hydroxy-testostérone ou 16  $\alpha$ -hydroxy,  $\Delta$  4-androstènedione.

nément des gonadotrophines chorioniques (l'augmentation est alors de 95,5  $\mu\text{g}$ ).

L'addition de 10 mg de 16 $\alpha$ -OH- $\Delta$ 4-androstène-3-17-dione ou de 16 $\alpha$ -OH-testostérone seuls est sans effet, car l'augmentation de l'œstriol n'est dans ce cas que de 14,6  $\mu\text{g}$ . Par contre, après addition de 20 mg d'acétate de 16 $\alpha$ -OH-œstrone, elle est de 1.400  $\mu\text{g}$ ; l'adjonction de gonadotrophines chorio-

riques n'étant pas nécessaire à cette transformation plus simple, qui ne met en œuvre que la  $17\beta$ -OH-déshydrogénase placentaire.

*Il semble donc bien que la voie principale de la biosynthèse de l'œstriol*

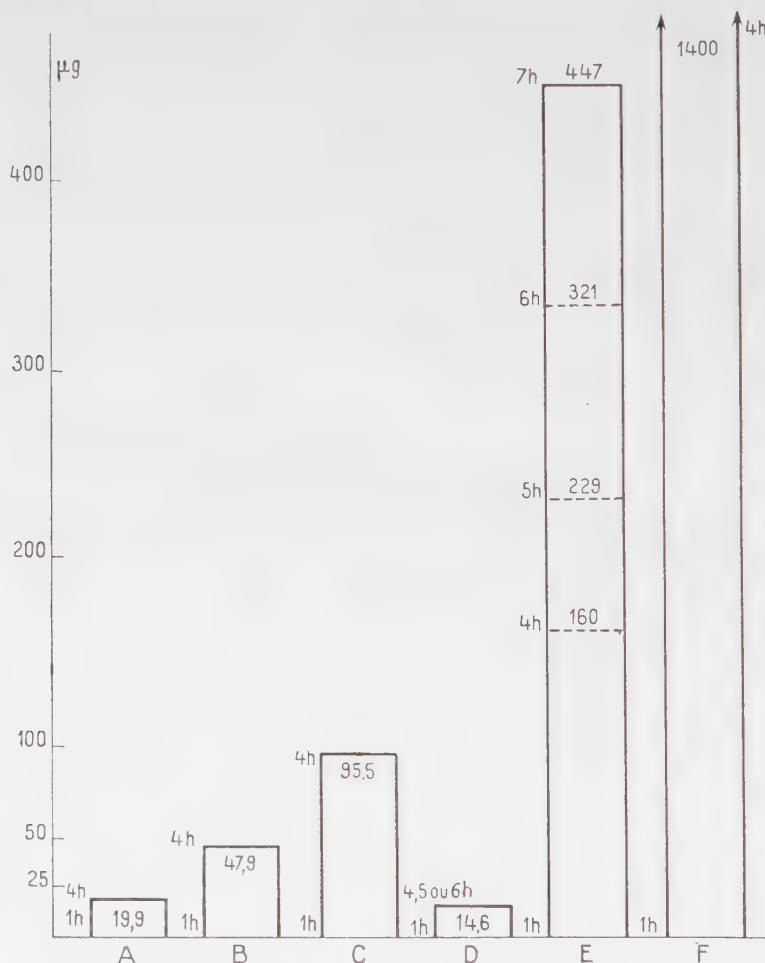


FIG. 31. — Augmentation de l'œstriol libre, au cours des divers types d'expériences.

A : Placenta témoin sans HP; B : + 20 mg d'œstrone ou d'œstradiol; C : + 20 mg d'œstrone ou d'œstradiol + 20.000 U.I. HCG; D : + 10 mg  $16\alpha$ -OH-testostérone ou  $16\alpha$ -OH- $\Delta$  4-androstènedione; E : + 10 mg  $16\alpha$ -OH-testostérone ou  $16\alpha$ -OH- $\Delta$  4-androstènedione + 20.000 U.I. HCG; F : + 20 mg  $16\alpha$ -OH-œstrone.

dans le placenta humain soit différente de celle de l'œstradiol et de l'œstrone et implique la conversion d'androgènes hydroxylés sur le carbone 16.

On peut objecter à cette théorie que l'on n'a jamais démontré que le

placenta peut produire ces précurseurs androgènes hydroxylés en C<sup>16</sup>; cependant ces substances ont été isolées dans les urines de grossesse (Marrion, 1944; Fotherby et collaborateurs, 1957). L'isolement par Neher et collaborateurs (1961) de la 16 $\alpha$ -OH-testostérone en quantités importantes (35  $\mu$ g/kg) à partir du tissu placentaire est un élément très convaincant.

*Il est très possible que la 16-hydroxylation s'effectue dans le fœtus*, Zander (1962) en effet a démontré que la progestérone 4-C<sup>14</sup> introduite par la veine ombilicale dans le fœtus humain est en partie convertie en 16 $\alpha$ -hydroxyprogestérone. De plus, très récemment, Colas et collaborateurs (1964) ont constaté l'existence dans la circulation fœtale de 16 $\alpha$ -OH déhydroépiandrosterone (3 $\beta$ , 16 $\alpha$ -dihydroxy-androstène 17-one) en quantités très importantes; la différence entre les concentrations dans l'artère et dans la veine ombilicales suggérant que cette substance sert de précurseur à l'œstriol placentaire.

Villee et collaborateurs (1961) ont également démontré l'existence d'une 16-hydroxylation par le tissu surrénal fœtal *in vitro*, aussi bien que par le tissu surrénal hyperplasique (Villee et collaborateurs, 1962; Ward et Grant, 1962; Weliky et Engel, 1963). L'hydroxylation en 16 de la progestérone, dont nous avons déjà vu précédemment qu'elle avait lieu dans le corps jaune (Zander et collaborateurs, 1962), a également été mise en évidence dans le reste de l'ovaire (Warren et Salhanick, 1961).

C'est donc un phénomène généralement répandu dont l'importance dans la biosynthèse des stéroïdes *in vivo* ne doit pas être négligée.

### ***Biosynthèse des œstrogènes à partir de stéroïdes à 18 ou 19 atomes de carbone neutres ou substitués***

**1° Données de la littérature.** — Nous ne reviendrons pas sur le schéma général de biosynthèse des œstrogènes que nous avons exposé brièvement au début de cet ouvrage. Acétate, cholestérol, progestérone et testostérone peuvent tous, nous l'avons vu, servir de précurseur pour la formation des œstrogènes avec un rendement d'autant plus élevé qu'ils sont plus près du produit final.

Nous désirons simplement insister sur le mécanisme terminal, c'est-à-dire la transformation des androgènes en œstrogènes avec aromatisation du noyau A (fig. 32).

La conversion biologique des androgènes en œstrogènes est connue depuis de nombreuses années; il a cependant fallu l'emploi des isotopes radio-actifs pour établir une relation directe entre ces deux catégories d'hormones (Heard et collaborateurs, 1955; Wotiz et collaborateurs, 1955 b). Cette transformation est un processus général qui a été aussi bien obtenu avec des micro-organismes qu'avec des corps jaunes de ratte (Alloiteau, 1960), ou divers tissus humains (ovaires, surrénales, testicules, placenta).

Nous nous limiterons à l'exposé des mécanismes possibles de la transformation des androgènes en œstrogènes dans le placenta humain. Nous ne voulons pas rentrer ici dans le détail des réactions qui interviennent et dont un certain nombre de points prêtent encore à controverse (voir à ce sujet l'article de Longchamp, 1961).

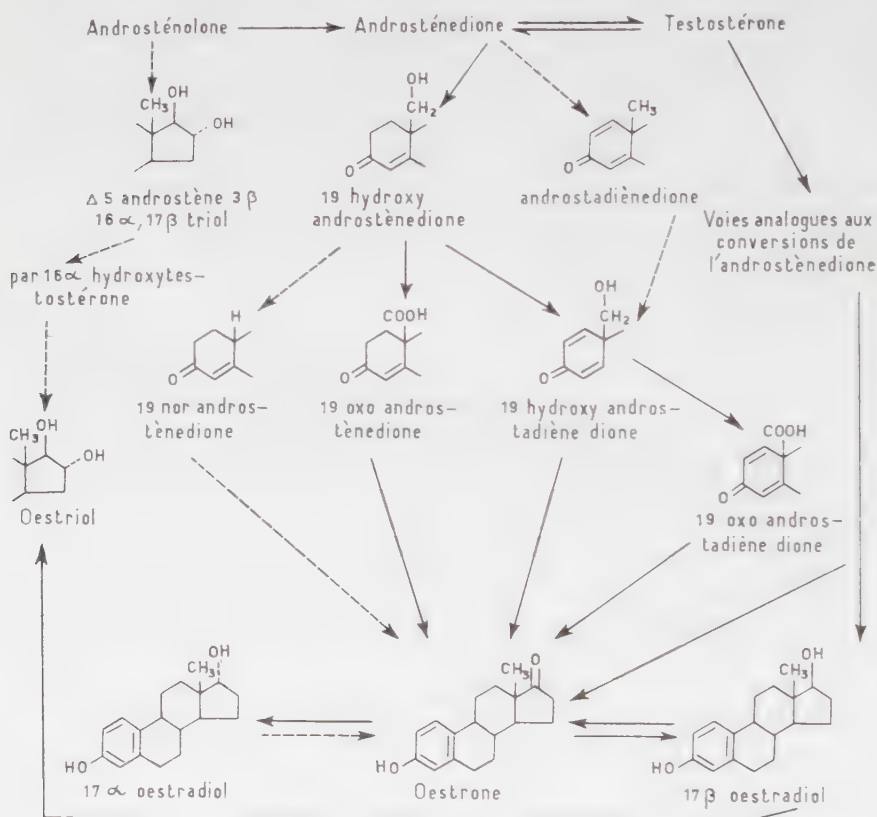


FIG. 32. — Transformation des androgènes en œstrogènes (d'après WETTSTEIN, 1961).

Certaines transformations, telle la  $\Delta^1$ -déshydrogénation décrite avec plusieurs micro-organismes (Longchamp et collaborateurs, 1960 b; Dodson et Muir, 1961; Sih, 1962), n'ont pas encore été démontrées dans les tissus des mammifères.

Ryan (1958-1959) a obtenu une conversion des androgènes en œstrogènes avec un fort rendement par un système enzymatique comprenant : des microsomes placentaires humains, la forme réduite du triphosphopyridine nucléotide ou un système générateur de T.P.N.H. et de l'oxygène.

La transformation de nombreux stéroïdes a été étudiée depuis lors avec

TABLEAU XXVII. — CONVERSION DE DIVERS COMPOSÉS EN STRUCTURES PHÉNOLIQUES.

| <i>Substrats</i>                                                                                                        | <i>%<br/>Conversion</i> | <i>Produits<br/>phénoliques</i>              |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|----------------------------------------------|
| <b>C<sup>10</sup></b>                                                                                                   |                         |                                              |
| 10-hydroxyméthyl- $\Delta$ 1(9)-octal-2-one .....                                                                       | 0                       |                                              |
| 10-carboxy- $\Delta$ 1(9)-octal-2-one .....                                                                             | 0                       |                                              |
| <b>C<sup>15</sup></b>                                                                                                   |                         |                                              |
| 19-nor-4-androstène-3,17-dione .....                                                                                    | 10                      | Œstrone, œstradiol                           |
| 17 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -10 $\beta$ -œstrane-3-one .....                                                         | 0                       |                                              |
| 5 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -œstrane-3,17-dione .....                                                                       | 0                       |                                              |
| 17 $\alpha$ -éthynyl-17 $\beta$ -hydroxy-19-nor-5(10)-andro-<br>stène-3-one .....                                       | 0                       |                                              |
| B-nor-17 $\beta$ -hydroxy-4-androstène-3-one .....                                                                      | 30                      | Probablement<br>B-norœstradiol               |
| 17 $\alpha$ -éthynyl-10 $\beta$ -17 $\beta$ -dihydroxy-andostène-<br>3,17-dione .....                                   | 0                       |                                              |
| <b>C<sup>19</sup></b>                                                                                                   |                         |                                              |
| 4-androstène-3,17-dione .....                                                                                           | 60                      | Œstrone, œstradiol                           |
| 19-hydroxy-4-androstène-3,17-dione .....                                                                                | 80                      | Œstrone, œstradiol                           |
| 17 $\beta$ -hydroxy-4-androstène-3-one (testosté-<br>rone) .....                                                        | 60                      | Œstrone, œstradiol                           |
| 3 $\beta$ -hydroxy-5-androstène-3-one (déhydro-épi-<br>androstérone) .....                                              | 40                      | Œstrone, œstradiol                           |
| 1,4-androstadiène-3,17-dione .....                                                                                      | 35                      | Œstrone, œstradiol                           |
| 5 $\alpha$ -androst-1-ène-3,17-dione .....                                                                              | 0                       |                                              |
| 5 $\alpha$ -androstane-3,17-dione .....                                                                                 | 0                       |                                              |
| 1 $\alpha$ -hydroxy-4-androstène-3,17-dione .....                                                                       | 0                       |                                              |
| 1 $\alpha$ ,3 $\beta$ -dihydroxy-5-androstène-17-one .....                                                              | 0                       |                                              |
| 1 $\alpha$ -méthyl-17 $\beta$ -hydroxy-4-androstène-3-one ..                                                            | 0                       |                                              |
| 2 $\beta$ -hydroxy-4-androstène-3,17-dione .....                                                                        | 10                      | Probablement<br>2-hydroxyœstrone             |
| 2-hydroxyméthylène-17 $\alpha$ -méthyl-17 $\beta$ -<br>hydroxy-4-androstène-3-one .....                                 | 0                       |                                              |
| 2 $\beta$ -méthyl-17 $\beta$ -hydroxy-4-androstène-3-one ..                                                             | 0                       |                                              |
| 2-formyl-17 $\alpha$ -méthyl-17 $\beta$ -hydroxy-1,4-andro-<br>stadiène-3-one .....                                     | 0                       |                                              |
| 4,6-androstadiène-3,17-dione .....                                                                                      | 0                       |                                              |
| 1,4,6-androstatriène-3,17-dione .....                                                                                   | 0                       |                                              |
| 4-androstène-3,11,17-trione .....                                                                                       | 0                       |                                              |
| 11 $\beta$ -hydroxy-4-androstène-3,17-dione .....                                                                       | 0                       |                                              |
| 11 $\alpha$ -hydroxy-4-androstène-3,17-dione .....                                                                      | 60                      | Probablement<br>11 $\alpha$ -hydroxyœstrone  |
| 6 $\alpha$ -fluoro-17 $\beta$ -hydroxy-4-androstène-3-one ..                                                            | 0                       |                                              |
| 6 $\beta$ -fluoro-17 $\beta$ -hydroxy-4-androstène-3-dione ..                                                           | 0                       |                                              |
| 9 $\alpha$ -fluoro-1,4-androstadiène-3,17-dione .....                                                                   | 35                      | Probablement<br>9 $\alpha$ -fluoroœstrone    |
| 9 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-4-androstène-3-one .....                                                              | 30                      | Probablement<br>9 $\alpha$ -hydroxyœstradiol |
| <b>C<sup>21</sup></b>                                                                                                   |                         |                                              |
| 4-pregnène-3,20-dione (progestérone) .....                                                                              | 0                       |                                              |
| 17 $\alpha$ -17 $\beta$ ,21-trihydroxy-4-pregnène-3,20-dione ..                                                         | 0                       |                                              |
| 17 $\alpha$ ,19,21-trihydroxy-4-pregnène-3,20-dione ..                                                                  | 0                       |                                              |
| 6 $\beta$ -fluoro-16 $\alpha$ -méthyl-21-acétoxy-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ -<br>dihydroxy-1,4-pregnadiène-3,20-dione .... | 0                       |                                              |

(D'après GUAL, MORATO, HAYANO, GUT et DORFMAN, 1962.)

cette préparation tissulaire essentiellement par Ryan et par Dorfman et collaborateurs, grâce à l'incubation de substances radio-actives.

La découverte par Meyer (1955) que les glandes surrénales de bœuf sont capables d'introduire une fonction hydroxyle sur le groupement méthyle en C<sup>19</sup> de la  $\Delta^4$ -androstène-3-17-dione fut suivie de l'hypothèse que le départ de ce groupement méthyle angulaire serait facilité par une oxygénation préalable. La conversion de la 19-hydroxy- $\Delta^4$ -androstène-3-17-dione en œstrone par le tissu placentaire fut ultérieurement démontrée par Meyer (1955), Ryan (1959 a), Longchamp et collaborateurs (1960 a). A partir de cet intermédiaire hydroxylé, plusieurs voies métaboliques sont possibles pour la formation du noyau A phénolique, différant entre elles par le stade d'oxydation auquel le groupement méthyle angulaire est éliminé.

Il peut y avoir en particulier une oxydation supplémentaire de l'aldéhyde formant le dérivé carboxylique correspondant, et suivie d'une décarboxylation conduisant au composé 19 nor. Cependant, outre le fait que l'on n'a jamais isolé de décarboxylase parmi les différents enzymes effectuant l'aromatisation du noyau A, les expériences effectuées par différents auteurs : Ryan (1959 a), Gual et collaborateurs (1962) ont montré que les composés 19 nor se transformaient au cours des incubations placentaires beaucoup moins aisément en œstrogènes que les stéroïdes possédant le méthyle angulaire C<sup>19</sup> (tableau XXVII).

Une autre possibilité est le départ du groupement aldéhydique avec un hydrogène adjacent sous forme de formaldéhyde; à l'appui de cette hypothèse, on peut citer le fait que Breur et Grill (1961) ont trouvé un rapport moléculaire égal à 1 entre cette substance et l'œstrone après incubation d'androstènedione et de 19-hydroxy-androstènedione.

**2° Résultats personnels.** — Il nous a paru intéressant de reprendre les travaux effectués sur des préparations de microsomes placentaires par Meyer, Ryan, Dorfman et ses collaborateurs, avec des placentas entiers et ceci pour deux raisons :

— pour voir si de telles expériences entraînaient ou non la production d'œstrone,

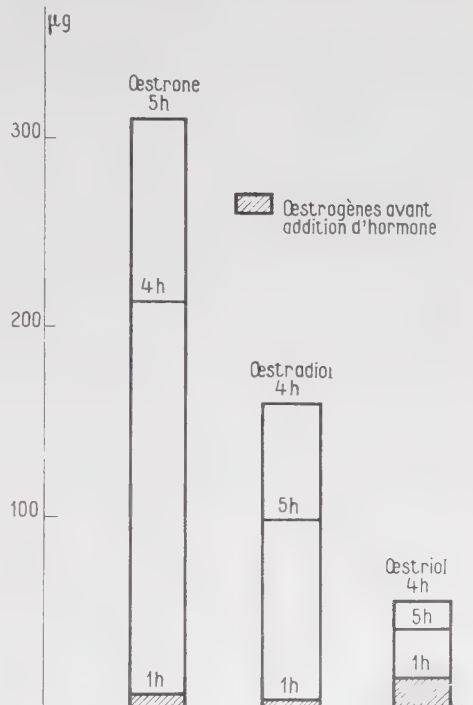
— pour étudier le rendement respectif des divers stéroïdes étudiés et tenter d'en déduire des conclusions sur les précurseurs réels des œstrogènes.

Aussi, dans une dernière série d'expériences comportant 36 perfusions, nous avons ajouté au liquide circulant 10 mg ou beaucoup plus rarement 20 mg de stéroïdes à 21,18 et surtout 19 atomes de carbone, neutres ou substitués. Chaque stéroïde étudié a fait l'objet de deux ou trois expériences afin d'éliminer les écarts dus aux hasards de l'expérimentation et en particulier à un vieillissement ou une anoxie placentaires antérieurs à la perfusion.

Nous avons pu tirer de ces expériences un certain nombre de conclusions :

a) Nous avons pu constater que l'aromatisation des androgènes n'aboutit qu'à une formation quasi exclusive d'œstrone et d'œstradiol. L'œstriol en subit dans tous les cas qu'une augmentation très modérée (l'augmentation moyenne de l'œstriol libre est de 15,7  $\mu\text{g}$  entre 1 et 4 heures de perfusion, l'œstriol conjugué n'augmentant en moyenne que de 2,5  $\mu\text{g}$ ), du même ordre de grandeur que celle observée au cours des expériences témoins (15,3  $\mu\text{g}$  pour l'œstriol libre). L'œstrone et l'œstradiol augmentent d'une ma-

FIG. 33. — Augmentation moyenne des œstrogènes après addition simultanée de 10 mg de 19-OH-androstènedione et de 20.000 U.I. d'HCG (3 expériences).



nière beaucoup plus considérable, faisant ainsi disparaître la prédominance physiologique de l'œstriol.

b) La figure 33 indique à titre d'exemple les valeurs moyennes obtenues dans trois perfusions de placentas à terme après addition de 20.000 U.I. de gonadotrophines chorioniques et de 10 mg de 19-OH- $\Delta^4$ -androstène-3-17-dione.

La valeur moyenne de l'œstradiol libre est de 160,5  $\mu\text{g}$  3 heures après l'addition d'hormones, diminuant légèrement ensuite, alors que l'œstrone libre continue à augmenter atteignant 309  $\mu\text{g}$  à la fin de la 5<sup>e</sup> heure de perfusion; l'œstriol ne dépasse pas 54,9  $\mu\text{g}$  et il se forme très peu d'œstrogènes conjugués; une expérience témoin effectuée sans placenta a montré que le liquide de perfusion seul n'avait aucun pouvoir d'aromatisation. Par contre, une expérience de perfusion placentaire avec addition de 19-OH- $\Delta^4$ -androstène-3-17-dione seulement sans gonadotrophines chorioniques a permis la synthèse d'une quantité importante d'œstrone et d'œstradiol.

c) La figure 34 indique les rendements respectifs moyens de nos diverses expériences. Il nous semble intéressant de les rapprocher du tableau récapit-

tulatif (tableau XXVII) des résultats obtenus par Dorfman et ses collaborateurs grâce à l'incubation d'un grand nombre de stéroïdes radio-actifs avec des préparations de microsomes placentaires + T.P.N.H. et oxygène.

Il est bien évident que nos conditions d'expériences ne permettent pas l'obtention d'un rendement comparable à celui des incubations tissulaires. Il existe en effet dans les perfusions placentaires un catabolisme permanent, l'augmentation des œstrogènes ne pouvant être caractérisée que si

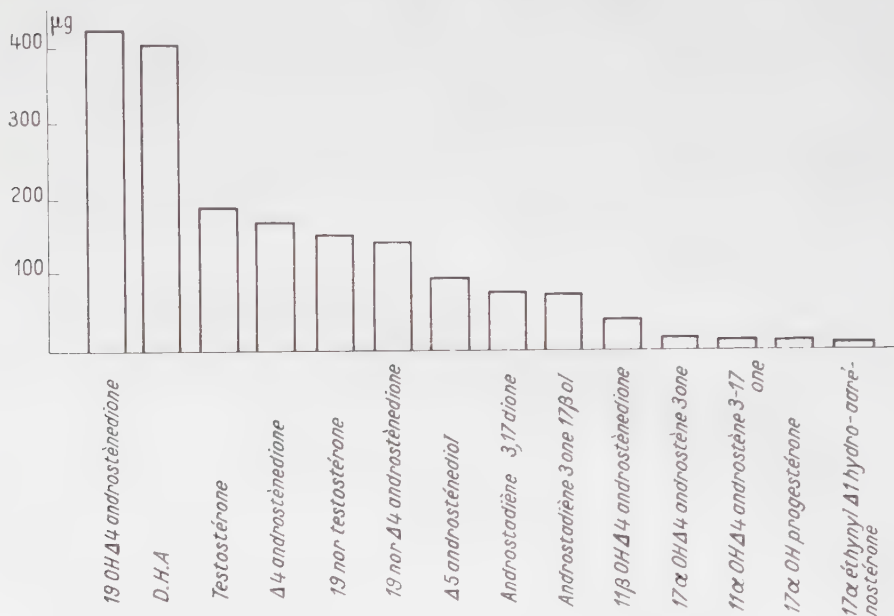


FIG. 34. — Valeur moyenne de l'œstrone et de l'œstradiol libres et conjugués après addition de stéroïdes en C19 et C21 neutres ou substitués (déduction faite des quantités contenues dans le liquide après 1 heure de perfusion sans addition d'hormones).

la synthèse excède la destruction; c'est ce qui explique en particulier que la concentration dans le liquide de perfusion diminue souvent après la 5<sup>e</sup> heure.

En dépit de ces différences expérimentales, nous avons pu observer un certain nombre de faits parallèles à ceux de Dorfman et collaborateurs.

a) Dans les perfusions de placentas entiers comme avec les préparations de microsomes, le rendement maxima est obtenu avec la 19-OH-Δ4-androstène-3-17-dione; 4,2 % de celle-ci sont en effet transformés en œstrone et œstradiol (essentiellement sous forme libre). Tous les auteurs s'accordent à considérer cette substance comme un intermédiaire important dans l'aromatisation des androgènes. N. Hollander a cependant démontré qu'elle n'était pas un stade obligatoire de ce processus (1962).

β) La *testostérone* et la *Δ4-androstène-3-17-dione* sont également transformées en œstrone et en œstradiol de façon importante et le rendement moyen est similaire pour ces deux hormones (respectivement 3,0 et 3,3 %).

γ) La *déhydro-épi-androstérone* semble, au contraire de ce qui se passe avec les microsomes placentaires, être un précurseur des œstrogènes plus efficace que les *Δ4-3-cétones*. 4 % en effet sont retrouvés sous forme d'œstrone et d'œstradiol après addition de 10 mg d'hormone pure. Une telle constatation est d'un grand intérêt, car Migeon et collaborateurs (1955) ont montré que le sulfate de *déhydro-épi-androstérone* est présent en grandes quantités dans le sang maternel et fœtal. Warren et collaborateurs (1962) ont également démontré la présence dans le placenta d'une sulfatase capable de libérer rapidement la *déhydro-épi-androstérone* libre à partir de son ester sulfate. Ces auteurs pensent que le placenta est capable de libérer ainsi une quantité de *déhydro-épi-androstérone* suffisante pour servir de précurseur majeur aux œstrogènes placentaires.

Par ailleurs, en 1963, Baulieu et Dray d'une part, Siiteri et Mac Donald d'autre part, puis Bolté et collaborateurs (1964 a, b, c) ont démontré par des expériences effectuées *in vivo*, que la *déhydro-épi-androstérone* et son sulfate servent de précurseurs à la majeure partie des œstrogènes synthétisés au cours de la grossesse.

Nous signalerons également que Baulieu, Wallace et Lieberman (1963) ont pu obtenir la formation de *testostérone-17α-H3* après incubation d'homogénats de placenta humain avec la *Δ5-androstène-3-17β-diol-17α-H3* (rendement de 50 %) et émis l'hypothèse d'une production de *testostérone* donc ultérieurement d'œstradiol et d'œstrone dans le placenta à partir de la *déhydro-épi-androstérone* par réduction de la cétone en C<sup>17</sup> avec formation intermédiaire de *Δ5-androstène-diol*. Nous rappellerons également que l'hydroxylation en C<sup>16</sup> de ce diol conduit au *Δ5-androstène-3β,17β,16α-triol*, précurseur direct de l'œstriol.

L'expérience que nous avons effectuée avec 20 mg de *Δ5-androstène-diol* nous a permis de constater une augmentation de l'œstrone et de l'œstradiol libres et conjugués de 95,8 μg 3 heures après l'addition d'hormones (rendement 0,45 %). Elle atteignait dans une autre expérience 155,6 μg 5 heures après l'addition de 10 mg de *Δ5-androstène-diol*, soit un rendement de 1,6 %.

δ) Nous avons constaté comme Dorfman et collaborateurs que l'introduction d'une double liaison supplémentaire (1.4-androstadiène-3-17-dione ou 1.4-androstadiène-3-one-17β-ol) ou la déméthylation préalable en C<sup>19</sup> (19-nortestostérone, 19-nor-Δ4-androstérone-3-17-dione) ne facilitent aucune-ment la transformation en œstrogènes, le pourcentage moyen d'hormone transformée en œstrone et œstradiol étant de 1,4 ou 1,5 % pour les dérivés 19 nor et de 0,7 % pour les Δ1-4-diènes.

ε) La présence de substituants axiaux sur le carbone 11 perturbe l'aromatization du noyau A, qu'il s'agisse de 11α-OH ou de 11β-OH (rendements

respectifs : 0,1 et 0,4 %). De même la  $17\alpha$ -OH- $\Delta^4$ -androstène-3-one est très peu convertie en œstrone et œstradiol- $17\beta$  (0,1 %). Le problème de l'aromatization des  $C^{19}$ -stéroïdes substitués en 11 a été étudié par Ryan (1959 a) et par Breuer (1962). Ce dernier conclut à une impossibilité stérique si l'hydroxyle est en  $11\beta$ .

ξ) Enfin, la  $17\alpha$ -OH-progestérone comme la progestérone ne sont pratiquement pas transformées en œstrogènes ni dans nos conditions d'expériences ni avec les microsomes placentaires.

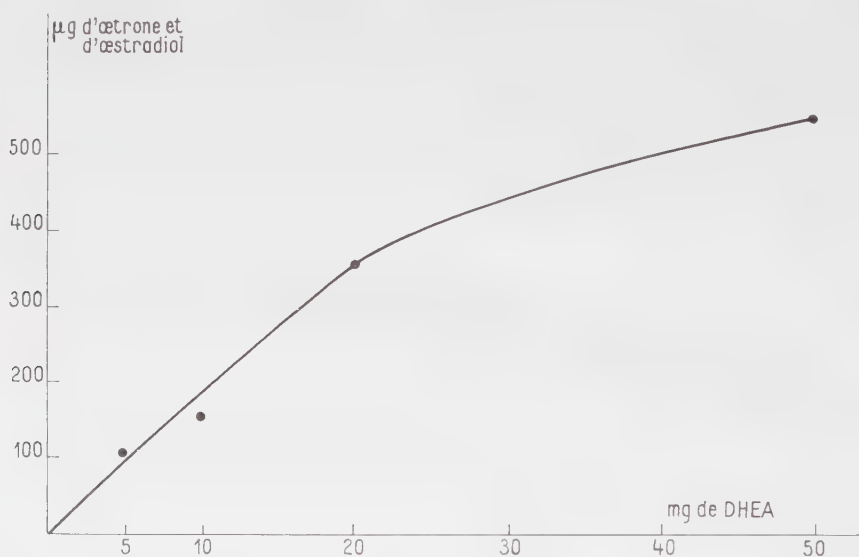


FIG. 35. — Augmentation de l'œstrone et de l'œstradiol dans le liquide de perfusion : variation en fonction de la quantité de DHEA ajoutée.

d) On peut remarquer également que la présence en  $C^{17}$  d'un groupement cétonique ou  $17\beta$ -hydroxylé n'a aucune influence, le rendement est strictement identique dans les deux cas, avec prédominance de l'œstrone sur l'œstradiol dans un rapport 3/1, indiquant qu'au cours de nos expériences de perfusion la  $17\beta$ -ol-déshydrogénase placentaire continue à fonctionner correctement.

Nous n'avons pas expérimenté les substances dont le noyau A est saturé, sachant qu'elles sont inactives aussi bien avec les préparations microsomiques (Gual et collaborateurs, 1962) qu'avec les corps jaunes de rattes (Alloiteau et collaborateurs, 1960).

e) N'ayant pu pour des raisons matérielles utiliser des corps radioactifs qui ont l'avantage de pouvoir être employés à doses traceuses, nous avons voulu vérifier que les quantités de stéroïdes que nous utilisons (le

plus souvent 10 mg) ne sont pas anormalement élevées et correspondent aux possibilités catalytiques des microsomes placentaires.

Nous avons pu constater dans une série d'expériences effectuées avec des quantités croissantes de déhydro-épi-androstérone (de 5 à 50 mg) que *l'augmentation de l'œstrone et de l'œstradiol mesurée 4 heures après l'addition de D.H.E.A. croissait en fonction de la quantité de substrat ajoutée d'une manière absolument typique des réactions enzymatiques*. Le produit des réactions enzymatiques augmente en effet en fonction de la concentration de substrat, d'abord de façon linéaire, puis plus lentement jusqu'à un palier de saturation qui pour nos expériences de perfusion semble voisin de 500  $\mu$ g d'œstrogènes.

La figure 35 montre bien que pour les quantités de 10 ou 20 mg de stéroïdes neutres utilisées nous sommes loin de ce palier de saturation et donc dans de bonnes conditions expérimentales.

Nous dirons enfin qu'au cours d'expériences que nous avons effectuées avec le professeur Breuer et ses collaborateurs (1964), nous avons pu mettre en évidence la capacité qu'a le placenta humain perfusé *in vitro* de transformer l'androst. 5 ène  $3\beta$ -7 $\beta$ -17 $\beta$ -triol en androst. 5 ène  $3\beta$ -17 $\beta$ -diol-7-one et en androst. 5 ène  $3\beta$ -7.17-dione aussi bien qu'en 7 $\beta$ -hydroxyœstradiol et 7-oxo-œstrone. Par contre après perfusion avec de l'androst. 5 ène  $3\beta$ -17 $\beta$ -diol-7-one, nous n'avons retrouvé aucun métabolite phénolique.

### *Influence des gonadotrophines chorioniques*

**1° Résultats personnels.** — Nous avons au cours de divers types d'expériences pu constater le rôle favorisant des gonadotrophines chorioniques sur un certain nombre de réactions : hydroxylation de l'œstradiol en œstriol, aromatisation de stéroïdes neutres ou hydroxylés sur le carbone 16, et nous avons ultérieurement tenté par une étude cinétique de ces transformations de le mettre en évidence.

Nous avons en effet signalé précédemment que la formation d'œstriol après addition d'œstradiol au liquide de perfusion était statistiquement plus élevée après adjonction simultanée de gonadotrophines chorioniques (93,5  $\mu$ g au lieu de 47,9  $\mu$ g), ainsi que Troën (1961) l'avait aussi constaté.

Nous avons également pu remarquer que les gonadotrophines chorioniques avaient un rôle stimulateur dans l'aromatisation des stéroïdes neutres : testostérone,  $\Delta$ 4-androstène-3-17-dione, ou hydroxylés en 16, alors que l'aromatisation de la 19-OH- $\Delta$ 4-androstènedione en œstrone et œstradiol était aussi élevée sans addition d'hormones gonadotropes (550  $\mu$ g) (tableau XXVIII). Ceci nous a amenés à rapprocher cet effet stimulateur du précédent et à penser que les gonadotrophines chorioniques agissaient lors de l'hydroxylation en C<sup>19</sup> des androgènes qui semble le premier stade de leur aromatisation.

Nous avons entrepris, suivant les conseils du professeur Breuer, une étude cinétique des processus d'aromatisation en ajoutant successivement à 1 heure d'intervalle 10 mg de stéroïdes et 20.000 U.I. de gonadotrophines chorioniques et en effectuant 5 ou 6 prélèvements successifs dans chaque expérience (fig. 36).

a) Nous avons ainsi pu constater qu'en l'absence de gonadotrophines chorioniques la  $\Delta 4$ -androstènedione était progressivement transformée en

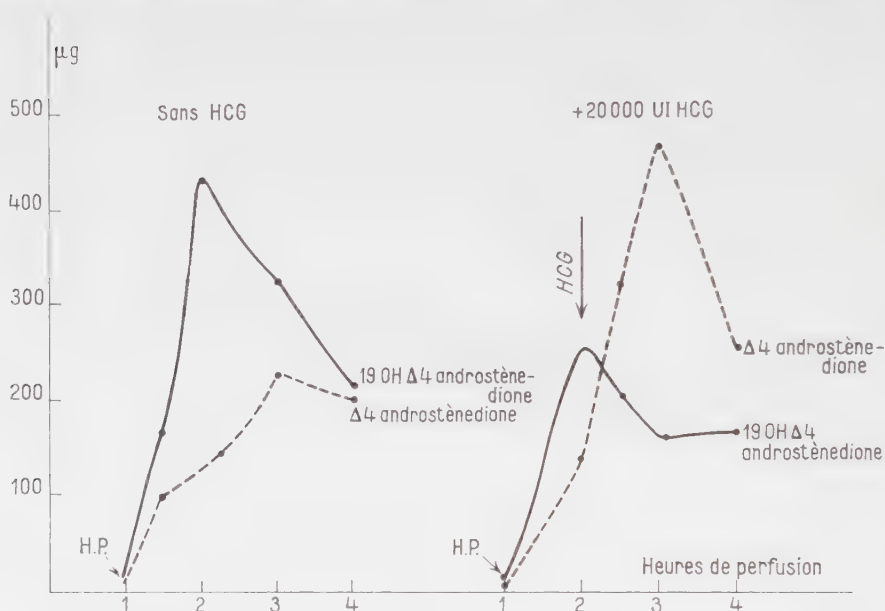


Fig. 36. — Influence des hormones gonadotropes chorioniques humaines sur l'aromatisation de la  $\Delta 4$ -androstènedione et de la 19-OH- $\Delta 4$ -androstènedione.

œstradiol et surtout en œstrone, essentiellement sous forme libre. La valeur maxima (227,6  $\mu\text{g}$ ) étant obtenue 3 heures après l'addition du stéroïde neutre.

Dans une autre expérience, l'addition ultérieure de H.C.G. a produit une augmentation considérable du rendement, avec une véritable angulation de la courbe, la valeur maxima (465,3  $\mu\text{g}$ ) étant également obtenue 3 heures après l'addition du stéroïde neutre.

b) Avec la 19-OH- $\Delta 4$ -androstènedione, nous avons tout d'abord pu constater que la concentration maxima en œstrone et œstradiol (435  $\mu\text{g}$ ) était atteinte beaucoup plus rapidement, 1 heure seulement après l'addition du stéroïde, ce qui indique bien qu'il s'agit là d'un précurseur plus immédiat des œstrogènes et qu'elle diminuait ensuite progressivement.

Les deux expériences suivantes nous ont montré que l'addition de gonadotrophines chorioniques ne modifiait absolument pas l'allure de la courbe

TABLEAU XXVIII. — AUGMENTATION DE L'ŒSTRONE ET DE L'ŒSTRADIOL LIBRES ET CONJUGUÉS  
TROIS HEURES APRÈS L'ADDITION DE STÉROÏDES EN C<sup>10</sup>.

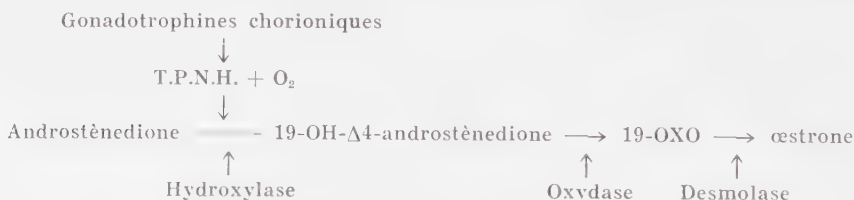
| Sans H.C.G.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                      |                           | Avec 20.000 U.I. H.C.G. |                      |                                         |                       |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|---------------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------------------------|-----------------------|
| Hormone ajoutée                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Nombre d'expériences | Valeur obtenue en µg et % | Hormone ajoutée         | Nombre d'expériences | Valeur moyenne (valeurs extrêmes) en µg | Valeur en pourcentage |
| 20 mg Δ4-androstène-3,17-dione . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 1                    | 18,1 µg (0,09 %)          | 10 mg                   | 1                    | 323,8                                   | 3,2 %                 |
| 20 mg Δ-5-androstène-3,17 dione . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 1                    | 15,5 µg (0,07 %)          | 10 mg                   | 2                    | 94,3<br>(92,8 et 95,8)                  | 0,9 %                 |
| 10 mg 19-OH-Δ4-androstène-3,17-dione                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 1                    | 548,6 µg (5,4 %)          | 10 mg                   | 4                    | 424,1<br>(de 103,7 à 725,7)             | 4,2 %                 |
| 10 mg D.H.E.A. . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . |                      |                           |                         |                      |                                         |                       |

et n'augmentait nullement le rendement, qui en fait est nettement inférieur à ceux de l'expérience précédente, sans que nous sachions exactement pourquoi. Peut-être en présence de H.C.G. l'œstrone et l'œstradiol sont-ils plus rapidement métabolisés. L'œstriol est évidemment plus élevé dans les expériences avec H.C.G. que dans la première expérience (valeur moyenne en fin de perfusion : 24,5  $\mu$ g au lieu de 7,8).

**2° Discussion.** — Il semble donc que les gonadotrophines chorioniques agissent directement dans le placenta sur les processus d'hydroxylation et que c'est par ce moyen qu'elles activent l'aromatisation. On peut rapprocher cette constatation de l'action stimulante de l'A.C.T.H. sur la stéroïdogénèse dans les cortico-surrénales *in vitro* (Peron, 1961). En effet, l'A.C.T.H., le T.P.N.H. et l'adénosine-3-5-phosphate augmentent la synthèse de la corticostérone dans des proportions identiques, suggérant que l'A.C.T.H. agit sur la stéroïdogénèse par l'élévation de la phosphorylase surrénalienne qui produit glucose 1 Phosphate et glucose 6 Phosphate. Ce dernier, par l'intermédiaire du cycle des pentoses phosphates produit le T.P.N.H. nécessaire aux processus d'hydroxylation.

De même, l'hormone lutéinisante (L.H.) augmente la biosynthèse de la progestérone par le tissu lutéal *in vitro* (Savard et collaborateurs, 1963 b), comme les gonadotrophines sériques de jument gravide (Suarez-Soto et Legault-Démare, 1960; Gospodarowicz et Legault-Démare, 1963). Pour ce tissu cependant, la relation entre T.P.N.H. et L.H. est moins nette; s'il est certain que l'activité phosphorylante du corps jaune est augmentée par L.H. en même temps que la synthèse de la progestérone est stimulée, celle-ci est accrue par l'hormone lutéinisante au-dessus des taux produits par la saturation en T.P.N.H., ce qui doit faire envisager un mécanisme supplémentaire de stimulation.

Quoi qu'il en soit, il existe entre A.C.T.H., L.H. et gonadotrophines chorioniques une similitude d'action singulièrement frappante et qui nous a amenés à admettre le schéma proposé par Breuer (1963) :



Nous nous proposons de vérifier cette hypothèse par l'addition au liquide de perfusion de systèmes enzymatiques générateurs de T.P.N.H., afin de comparer la stimulation ainsi obtenue avec celle due aux gonadotrophines chorioniques.

## IV. — CONCLUSION

Nous avons pu maintenir en état de survie convenable 101 placentas pendant 4 à 6 heures, temps suffisant pour permettre une étude dynamique du métabolisme des œstrogènes. Nous avons ainsi constaté que le placenta continue à libérer des œstrogènes dans le milieu avec une prédominance nette de l'œstriol libre, et qu'il est capable de transformer les œstrogènes qu'on lui fournit.

Nous avons également pu mettre en évidence par divers types d'expériences la capacité qu'a le placenta d'aromatiser les androgènes en œstrogènes et étudier le rendement respectif des diverses substances.

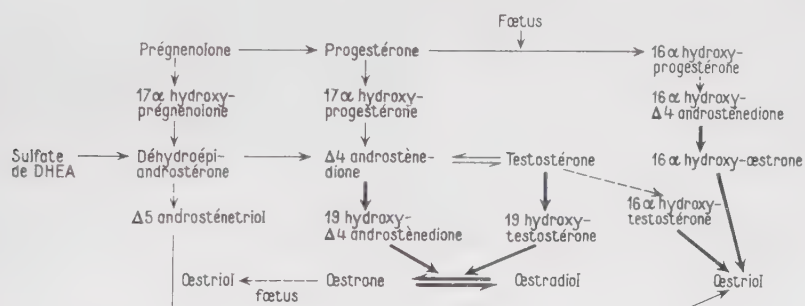


FIG. 37. — Schéma de la biogénèse des œstrogènes au cours de la grossesse humaine établi d'après les expériences effectuées *in vivo* et *in vitro* avec fœtus et placenta humain.

——— Expériences effectuées au laboratoire par perfusion de placenta *in vitro*.  
 ----- Réactions encore non démontrées.

Nous avons enfin pu vérifier que la biosynthèse de l'œstriol d'une part et de l'œstrone et de l'œstradiol d'autre part empruntent deux voies métaboliques distinctes (fig. 37) et que les gonadotrophines chorioniques semblent jouer un rôle favorisant sur le processus d'hydroxylation et par ce moyen sur l'aromatisation des androgènes. Nous voudrions avant de terminer ce chapitre faire quelques remarques :

**1° Ces conclusions sont valables pour les placentas à terme seulement.** — Nous avons en effet pu constater au cours de 4 perfusions de placentas immatures recueillis lors d'avortement thérapeutique de 10 à 20 semaines que la transformation de l'œstradiol en œstrone et de la 16α-OH-œstrone en œstriol ne s'y effectuait que d'une façon beaucoup plus modérée, le rapport œstrone/œstradiol restant dans ce type d'expé-

riences inférieur à 1, au contraire de ce que l'on obtient avec des placentas à terme, et l'hydroxylation en 16 semblant inexistante ainsi que Bolté et collaborateurs (1964 a) l'ont démontré par perfusion *in situ*.

De même, l'aromatisation de la 19-OH- $\Delta^4$ -androstènedione en œstrone n'a pu être effectuée qu'à une très faible échelle et est décelable seulement par une modification des proportions, l'œstrone l'emportant sur l'œstriol.

On peut donc conclure que dans les placentas jeunes existent 17 $\beta$ -ol-déshydrogénase et système enzymatique capable d'aromatiser les androgènes, mais en trop petite quantité étant donné le faible poids tissulaire (50 à 300 grammes dans nos expériences) pour pouvoir être extériorisées autrement que par les traceurs radio-actifs que nous nous proposons maintenant d'utiliser.

**2° Le problème des gonadotrophines.** — Nous avons vu précédemment la nécessité pour la réussite d'un certain nombre de réactions de l'addition complémentaire de gonadotrophines chorioniques. Une telle nécessité ne peut se concevoir que si l'on admet que le placenta humain perfusé *in vitro* est incapable de produire ces hormones gonadotropes. C'est l'opinion de Troën (communication personnelle). Nous avons pu constater avec le docteur Vassy que la quantité de gonadotrophines chorioniques contenue dans le liquide de perfusion était identique en début et en fin d'expérience (10.000 U.I. environ) sans aucune tendance à l'augmentation. On peut penser que les placentas à terme avec lesquels sont réalisés la plupart de nos expériences sont des organes sénescents. Il faut de plus noter que lors d'expériences de perfusion de placenta immatures *in situ* Bolté et collaborateurs (1964 a) n'ont pas retrouvé d'action stimulative des gonadotrophines chorioniques.

On peut également évoquer le fait que les hormones gonadotropes sont élaborées sur la face maternelle du placenta qui échappe dans une certaine mesure à la perfusion du circuit fœtal que nous réalisons. C'est pourquoi nous avons mis au point un système de perfusion à double circulation fœtale et maternelle et nous nous proposons de doser les gonadotrophines chorioniques dans ces deux circulations. D'ores et déjà nous devons signaler que la perfusion de la face maternelle, en particulier de la chambre intervillieuse, est de réalisation technique très difficile.

**3 Rôle du fœtus dans la biosynthèse de l'œstriol.** — On peut enfin remarquer qu'il ne se produit qu'une faible hydroxylation en C<sup>16</sup> dans nos conditions d'expériences aussi bien que dans celles des autres auteurs puisque, nous l'avons vu, seule l'addition de stéroïdes neutres ou phénoliques déjà hydroxylés sur le carbone 16 entraîne une production importante d'œstriol.

Cette constatation nous semble avoir un intérêt physiologique considérable. En effet, il est maintenant généralement admis que le prégnandiol

urinaire reflète l'état du placenta, alors que les œstrogènes, et plus particulièrement l'œstriol, sont un indice de la viabilité du fœtus (Ten Berge, 1960; Robey et collaborateurs, 1961; Jayle, 1962; Beling, 1963; Frandsen et Stakemann, 1963), tout en dépendant également du fonctionnement placentaire.

Cassmer (1959) a conclu de ses expériences que le rôle du fœtus est de maintenir une circulation placentaire adéquate, mais cette explication mécanique ne nous semble pas suffisante.

Frandsen et Stakemann (1961) ont constaté une excrétion œstrogénique faible au cours de cinq grossesses avec fœtus anencéphales. De même Coyle (1962) a dans quatre cas de ce genre et un cas de mort fœtale, avec cirrhose du foie, observé une diminution portant plus particulièrement sur l'œstriol.

Stakemann et Frandsen (1962) ont attiré l'attention sur le rôle de la surrénale fœtale. Ils ont injecté à des souris femelles castrées des extraits de placenta et de surrénale fœtale. Isolément ces deux extraits tissulaires n'ont pas d'action, mais injectés simultanément ils provoquent chez l'animal une réaction de coronification vaginale.

Nous avons vu précédemment que le fœtus *in vivo* (Zander, 1962) et la surrénale fœtale *in vitro* (Villem et collaborateurs, 1961) étaient capables d'effectuer une hydroxylation sur le carbone 16 de la progestérone.

On peut donc penser que *l'excrétion de l'œstriol au cours de la grossesse reflète le fonctionnement du bloc fœto-placentaire, le fœtus étant responsable de l'hydroxylation en C<sup>16</sup> et de la conjugaison qui facilite l'élimination urinaire, le placenta (fig. 37) réalisant l'aromatisation des androgènes en œstrogènes.*

**4° Les travaux récents de Diczfalussy et de ses collaborateurs** (Bolté et collaborateurs, 1964 a, b, c) réalisés avec des moyens très différents des nôtres (perfusion de placenta jeune *in situ*, injection *in vivo* dans les compartiments fœtaux et maternels de déhydro-épi-androstérone ou de sulfate de déhydro-épi-androstérone radio-actifs) ont abouti à des résultats complétant les nôtres. Comme nous, ils ont retrouvé dans le placenta 17 $\beta$ -ol-déshydrogénase, capacité d'aromatisation très élevée et pouvoir d'hydroxylation quasiment nul.

*Dans le fœtus, par contre, se produisent une importante sulfurylation et une légère 16-hydroxylation avec formation probable de 16 $\alpha$ -OH-œstrone qui serait ultérieurement réduite par le placenta en œstriol (réaction que nous avons pu réaliser *in vitro*). L'œstriol ainsi formé irait selon eux en partie dans l'organisme maternel, en partie dans l'organisme fœtal où il serait sulfurylé avant de revenir dans le placenta après hydrolyse (fig. 38).*

Ils pensent également à la formation par le fœtus à partir du sulfate de déhydro-épi-androstérone d'un intermédiaire neutre à 19 atomes de carbone hydroxylé en 16 avant son aromatisation (et nous avons montré



## QUATRIÈME PARTIE

# LES VERTÉBRÉS INFÉRIEURS ET LES INVERTÉBRÉS

## ŒSTROGÈNES CHEZ LES VERTÉBRÉS INFÉRIEURS ET LES INVERTÉBRÉS

### *Introduction*

L'étude de la biogénèse et du métabolisme des œstrogènes est restée longtemps limitée aux mammifères, en particulier aux euthériens. Ce n'est que très récemment que le rôle des œstrogènes a été mis en évidence dans la physiologie des vertébrés inférieurs.

Les techniques de détection classiques, en particulier les dosages biologiques, se sont révélées difficilement applicables aux très faibles quantités existantes. Il est nécessaire d'utiliser des procédés très sensibles et spécifiques. En effet, il est indispensable de s'assurer de la spécificité de la méthode employée, car, d'espèces en espèces, les métabolites principaux varient souvent, l'œstradiol-17 $\alpha$  par exemple semble caractéristique des bovidés, l'équiline et l'équilénine n'existent que chez certains animaux.

De même, les quantités d'œstrogènes trouvées chez les vertébrés inférieurs sont extrêmement faibles, de l'ordre de quelques  $\mu\text{g}$  par kg de tissu frais, rendant nécessaire l'emploi de méthodes très sensibles.

Il est donc obligatoire de travailler sur des quantités importantes de tissu ou de liquide biologique et, par suite, d'effectuer une purification suffisante des extraits (dégraissage, élimination des phénols), tout en conservant un pourcentage de récupération satisfaisant.

### *Historique*

Les premiers travaux effectués sur le métabolisme des œstrogènes chez les vertébrés inférieurs datent de 1957-1958.

a) **Dosages dans les tissus animaux.** — 1° **Chez les gallinacés.** — Hurst et collaborateurs (1957) ont signalé la présence d'œstrone, d'œstradiol et d'œstriol dans les excréments de poule et de coq par une analyse chromatographique.

Layne, Common et collaborateurs (1958) ont mis en évidence œstrone, œstradiol et œstriol dans l'ovaire de poule pondeuse par spectrographie en lumière ultraviolette et chromatographie.

Ce n'est qu'en 1959 qu'une identification certaine de l'œstradiol-17 $\beta$  a pu être effectuée : Mac Rae et collaborateurs (1959) ont isolé de l'œstradiol-17 $\beta$  à partir des excréments de poule pondeuse, le point de fusion et le spectre infrarouge correspondant exactement à ceux de l'hormone pure de synthèse.

Par notre technique de dosage fluorimétrique après chromatographie de partage sur colonne de célite, L. Gallien et M.T. Chalumeau (1958) ont pu mettre en évidence de l'œstrone et de l'œstradiol dans les gonades de l'embryon de poulet. Enfin Ainsworth et Common (1962 b) ont pu isoler et identifier de l'œstrone dans les urines de poule pondeuse.

2° **Chez les amphibiens.** — Gallien et Chalumeau (1960) ont trouvé de l'œstrone et de l'œstradiol-17 $\beta$  dans l'ovaire juvénile de *Xenopus laevis* Daudin.

Dale (1962) a identifié par chromatographie de l'œstradiol-17 $\beta$  dans l'eau d'élevage des larves de grenouille (*Rana pipiens*).

Tout récemment, Chieffi et Lupo (1963) ont trouvé par chromatographie sur papier dans les ovaires du crapaud (*Bufo vulgaris*) de l'œstradiol-17 $\beta$  et de l'œstriol. Mais jusqu'à présent aucun auteur n'a pu obtenir chez les amphibiens d'hormones cristallisées, les faibles quantités en présence ne permettant pas une identification précise.

3° **Chez les poissons.** — Après chromatographie et séparation à contre-courant, Wotiz, Botticelli et collaborateurs (1958) ont trouvé de l'œstradiol-17 $\beta$  dans les œufs ovariens de chien de mer (*Squalus suckleyi*).

En 1960, toujours chez le chien de mer, ces auteurs ont donné une preuve définitive de leurs premiers travaux en isolant de l'œstrone et de l'œstradiol cristallisés. L'étude des points de fusion et des spectres infrarouges a montré qu'il s'agissait effectivement de ces hormones.

Dean et Chester-Jones (1959), chez le protoptère (*Protopterus annectens*), ont pu constater par chromatographie sur papier et tests biologiques la présence d'œstrone, d'œstradiol et d'œstriol dans l'ovaire sans en apporter de réelle preuve physico-chimique.

Chez la roussette (*Scyllorhinus stellaris*), Chieffi et Lupo (1961) ont trouvé par chromatographie sur papier des extraits tissulaires de la testostérone et de l'œstradiol. Tout récemment (1963), ces auteurs ont trouvé dans l'ovaire du poisson-torpille (*Torpedo marmorata*) de l'œstradiol-17 $\beta$  (30  $\mu$ g par kg) et de l'œstriol (55  $\mu$ g/kg), ainsi que de l'œstrone et de

l'œstriol dans l'ovaire d'un téléostéen marin : *Conger conger* (Lupo et Chieffi, 1963).

De même, L. Galzigna (1961) a pu mettre en évidence de l'œstradiol-17 $\beta$  dans les ovaires de deux téléostéens (*Salmo irideus* et *Cyprinus carpio*) et de l'œstriol et de 16-épi-œstriol chez *S. irideus* seulement.

En 1962, Gottfried et collaborateurs ont pu identifier dans les œufs ovariens de la morue de l'œstrone et de l'œstradiol. De même, Simpson et collaborateurs (1963) ont trouvé de l'œstrone et de l'œstradiol-17 $\beta$  (19  $\mu$ g/kg chacun) dans les ovaires de *Scyllorhinus caniculus*, 80 % de ces hormones étant localisées dans les œufs.

4° **Chez les invertébrés.** — Clark et collaborateurs ont montré l'absence de synthèse des stérols chez les insectes (1959).

Les dosages biologiques effectués depuis 1930 ont montré la présence de traces d'œstrogènes chez les invertébrés marins tels que l'oursin (Steidl, 1930; Donahue, 1940), l'anémone de mer (Schwerdt-Feger, 1932) et certains mollusques. Donahue (1948) a pu, en combinant séparation par partage et fluorimétrie, constater dans les œufs de homards (*Homarus americanus*) la présence d'œstrogènes en quantité correspondant à 100 U.I. par 100 grammes.

Plus récemment, Hisaw (1961) a pu, à partir d'un poids considérable d'ovaires (10 à 14 kg) d'étoile de mer (*Pisaster ochraceus*), d'oursin (*Strongylocentrotus franciscanus*), et de *Pecten nericens*, mettre en évidence de l'œstradiol-17 $\beta$ . Aucune identification physico-chimique n'a été effectuée à l'heure actuelle chez les invertébrés.

b) **Métabolisme in vivo et in vitro.** — La majeure partie des travaux publiés sur le métabolisme des œstrogènes *in vitro* et *in vivo* ont été effectués chez la poule.

Mac Rae et collaborateurs (1959 a et b, 1960 a) ont isolé et caractérisé par chromatographie sur papier de l'œstrone, de l'œstradiol et du 16-épi-œstriol après injection de C<sup>14</sup>-œstradiol-17 $\beta$  après injection d'œstriol-<sup>14</sup>C.

Plus récemment, Ainsworth et collaborateurs (1962 a) ont signalé la présence d'œstradiol, d'œstriol, 16-épi et 17-épi-œstradiol, 16-céto-œstrone et 16-céto-œstradiol radio-actifs après injection d'œstrone-<sup>14</sup>C à une poule pondeuse. Enfin, chez les amphibiens et les poissons, Breuer, Ozon et Mittermayer ont (1963) étudié le métabolisme des œstrogènes au niveau du foie.

Ils ont mis en évidence les enzymes suivants : 17 $\beta$ -ol-déshydrogénase, 16 $\alpha$  et 16 $\beta$ -ol-déshydrogénase et uniquement chez les amphibiens une 16 $\alpha$  et une 6 $\alpha$ -hydroxylase.

### *Travaux personnels*

Nous avons personnellement étudié en relation avec les laboratoires de M. le professeur Fontaine et de M. le professeur Gallien, les modifications des œstrogènes sanguins au cours du cycle sexuel de quelques poissons et d'un batracien.

#### *a) Dosage des œstrogènes dans le sang de certains téléostéens.*

— Au cours de recherches effectuées avec T. Nomura, nous avons étudié les modifications saisonnières des hormones femelles dans le sang circulant de quelques téléostéens.

1° **Lieu d'origine des poissons.** — *a) TÉLÉOSTÉENS APODES.* — Nous avons étudié des anguilles (*Anguilla anguilla* L.) recueillies au mois de mars (Moret-sur-Loing), en septembre à Saint-Christ (Somme), enfin au lac de Grandlieu en novembre. Ces anguilles furent apportées dans l'aquarium du Muséum d'Histoire Naturelle où elles séjournèrent quelques jours avant les prélèvements.

Les congres (*Conger conger* L.) saignés à Biarritz en mars se trouvaient en stabulation à l'aquarium depuis plusieurs mois où ils recevaient une alimentation quotidienne et présentaient une croissance satisfaisante. Les congres et les murènes (*Murena Helena* L.) saignés à Monaco en mai avaient été capturés seulement quelques jours avant la prise de sang.

*b) TÉLÉOSTÉENS NON APODES.* — Les carpes (*Cyprinus carpio* L.) étudiées, furent achetées vivantes aux Halles Centrales de Paris et séjournèrent quelques jours dans l'aquarium du Muséum en février et en octobre.

2° **Technique de prélèvement.** — Le sang des anguilles, des congres et des murènes fut recueilli par section de l'aorte ventrale. Le sang des carpes fut prélevé par section de l'artère caudale.

Le sang ainsi obtenu fut immédiatement hépariné et gardé au frigidaire.

Les quantités prélevées sur chaque animal étant très faibles, on a constitué des « pools » de sang correspondant à des poissons morphologiquement semblables et ayant des rapports gono-somatiques très voisins.

Le transport des sangs de congres et de murènes fut effectué dans des petites glacières portatives et les dosages mis en route deux jours au maximum après le prélèvement.

3° **Technique de dosage et vérifications techniques.** — Nous avons utilisé tout d'abord notre technique habituelle de dosage des œstrogènes sanguins. Étant donné la haute teneur en lipides du sang des poissons, nous avons rapidement constaté qu'il était nécessaire de purifier de façon un peu différente les extraits, et nous avons introduit une extraction par la soude normale des œstrogènes phénoliques à partir d'un résidu toluénique qui retient les graisses, comme pour les extraits de tissus humains.

La méthode employée ayant déjà été soumise au contrôle des critères habituels : précision, sensibilité, exactitude et spécificité, nous avons plus particulièrement porté nos efforts sur la vérification de la spécificité de la technique dans son application au sang des poissons, et avons recueilli à ce sujet des éléments assez convaincants :

a) Le spectre de fluorescence, mesuré au spectrofluorimètre Farrand, montre des maxima d'excitation et d'émission très voisins de ceux des hormones pures.

b) Les extraits œstrogéniques après chromatographie contiennent des substances qui réagissent avec les réactifs de Brown et les valeurs obtenues par les deux réactions colorimétrique et fluorimétrique sont du même ordre de grandeur.

c) Des dosages biologiques furent effectués sur des échantillons de sang non chromatographiés par M<sup>me</sup> Colonge (laboratoire du professeur Courrier au Collège de France) sur des souris castrées. Dans les quatre extraits étudiés, les quantités injectées étaient voisines du seuil de réaction (0,9 µg) et ont provoqué des réactions positives avec cellules kératinisées et diminution des leucocytes, mais sans aller jusqu'au frottis de rut caractéristique.

La correspondance quantitative entre dosages biologiques et chimiques nous a semblé bonne, puisque chimiquement les quantités dosées étaient comprises entre 0,2 et 1 µg.

4° Enfin, nous avons effectué des chromatographies sur papier selon la technique de De Courcy (1956) — papier Whatman n° 1 — toluène/iso-octane/méthanol/eau — afin de voir si nous étions en présence d'œstradiol-17β ou 17α. Nous avons obtenu une tache révélée par la réaction de Barton (1952) et dont le R<sub>f</sub> correspondait exactement à l'œstradiol-17β. C'est d'ailleurs cet isomère que Wotiz avait identifié dans les ovaires de *Squalus suckleyi*.

La plupart des dosages ne portent que sur l'œstrone et l'œstradiol. Les quelques dosages d'œstriol effectués furent négatifs et nous avons vérifié par une chromatographie sur papier selon la technique d'Axelrod (1953) — papier Whatman n° 1-formamide/orthodichlorobenzène — faite sur un pool de 60 cm<sup>3</sup> de sang de congres et de murènes, l'absence de tache résiduelle correspondant à l'œstriol.

5° **Résultats.** — a) ANGUILLES. — Nous avons effectué 11 dosages sur des échantillons de sang prélevés chez 1 à 15 poissons femelles de R.G.S. voisins et morphologiquement semblables.

Le tableau XXIX résume les résultats obtenus. On constate que les concentrations d'œstrogènes dans le sang circulant subissent des variations saisonnières. En effet, au mois de mars (R.G.S. moyen 1,6), c'est-à-dire loin de la ponte, les quantités décelées sont très faibles, pratiquement

TABLEAU XXIX. — TENEUR EN CESTROGÈNES DU SANG DE CERTAINS TÉLÉOSTÉENS.  
(Valeurs moyennes exprimées en  $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$  de sang.)

| Date du prélèvement             | Sexe | Nombre d'animaux | R.G.S. | Œstrone | Œstradiol | Œstriol | Œstrogènes totaux<br>moyenne $\pm$<br>déviati<br>standard |
|---------------------------------|------|------------------|--------|---------|-----------|---------|-----------------------------------------------------------|
| <i>Anguilles :</i>              |      |                  |        |         |           |         |                                                           |
| 7 mars (2 dosages)              | F    | 21               | 1,6    | 0,7     | 0,1       | nul     | $0,8 \pm 0,0$                                             |
| 13 septembre (5 dosages)        | F    | 15               | 1,5    | 3,6     | 1,5       | nul     | $5,1 \pm 2,2$                                             |
| 7 novembre (4 dosages)          | F    | 16               | 0,4    | 2,5     | 1,7       | nul     | $4,2 \pm 0,5$                                             |
| <i>Congres :</i>                |      |                  |        |         |           |         |                                                           |
| 31 mars. Atlantique (3 dosages) | F    | 3                | 7,1    | 0,7     | 1,1       | nul     | $1,8 \pm 0,7$                                             |
| 8 mai. Méditerranée (2 dosages) | F    | 2                | 0,5    | 3,2     | 2,2       | nul     | $5,4 \pm 2,7$                                             |
| 8 mai. Méditerranée (2 dosages) | M    | 2                | 1,6    | 4,7     | 1,3       | nul     | $6,0 \pm 3,7$                                             |
| <i>Murènes :</i>                |      |                  |        |         |           |         |                                                           |
| 23 mai (3 dosages)              | F    | 5                | 0,4    | 11,7    | 7,2       | nul     | $18,9 \pm 1,9$                                            |
| 8 mai (9 dosages)               | M    | 12               | 0,04   | 5,7     | 2,3       | nul     | $8,0 \pm 1,9$                                             |
| <i>Carpes :</i>                 |      |                  |        |         |           |         |                                                           |
| 15 février (3 dosages)          | F    | 3                | 0,7    | 4,5     | 2,5       | nul     | $7,0 \pm 4,3$                                             |
| 15 février (3 dosages)          | M    | 3                | 5,9    | 2,4     | 1,5       | nul     | $3,9 \pm 2,5$                                             |
| 17 octobre (3 dosages)          | F    | 3                | 3,1    | 1,5     | 0,5       | nul     | $2,0 \pm 2,3$                                             |
| 17 octobre (3 dosages)          | M    | 3                | 6,8    | 0,7     | 0,4       | nul     | $1,1 \pm 1,3$                                             |

nulles (valeur moyenne de la somme œstrone + œstradiol :  $0,8 \mu\text{g} \pm 0,0 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ ).

Au mois de septembre (R.G.S. moyen 0,4), les concentrations d'œstrone et d'œstradiol sont beaucoup plus élevées, leur somme atteignant la valeur moyenne de  $5,1 \mu\text{g} \pm 2,2 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ .

Au mois de novembre (R.G.S. moyen 0,4), les concentrations d'œstrone et d'œstradiol sont également assez fortes et leur somme atteint la valeur moyenne de  $4,2 \mu\text{g} \pm 0,5 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ .

Les anguilles étudiées en mars et en septembre sont des anguilles argentées, alors qu'en novembre nous avons examiné des anguilles jeunes de R.G.S. beaucoup plus bas. Il n'y a cependant pas beaucoup de différence entre les anguilles argentées de septembre et les anguilles jaunes de novembre, alors que les anguilles argentées de mars sont beaucoup moins riches en œstrogènes.

b) CONGRES. — Nous avons examiné le sang de deux catégories différentes de congres, les uns pêchés en mars dans l'Atlantique, conservés longtemps en aquarium à Biarritz où ils étaient régulièrement nourris (seule la femelle de R.G.S. 17 % refusait la nourriture comme il est habituel chez les congres femelles proches de la maturité génitale), les autres pêchés en mai dans la Méditerranée et sacrifiés dès leur capture.

On constate en examinant le tableau XXIX que les congres femelles de l'Atlantique, de R.G.S. très variable, ont une concentration en œstrogènes assez faible (valeur totale :  $1,8 \mu\text{g} \pm 0,7 \mu\text{g}$  par 100 ml), mais que l'œstrone et l'œstradiol semblent augmenter dans le sang circulant en même temps que le R.G.S. s'élève.

Nous n'avons pu étudier cette relation entre R.G.S. et concentration en œstrogènes chez les congres de la Méditerranée.

Les deux femelles étudiées avaient un R.G.S. très faible (0,5) et étaient fort éloignées de la ponte. Leur œstrogénémie est beaucoup plus forte que dans l'autre catégorie (valeur moyenne totale :  $5,4 \mu\text{g} \pm 2,7 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ ). On trouve des taux semblables chez les deux mâles étudiés à ce moment ( $6,0 \mu\text{g} \pm 3,5 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ ).

Les différences écologiques et physiologiques étant importantes, on ne peut savoir à quoi est due exactement la différence entre les résultats obtenus. En effet, les congres de l'Atlantique, plus gros, avec de plus gros ovaires, et maintenus longtemps en aquarium, ont des taux beaucoup plus bas que les congres en liberté dans la nature, plus petits et de R.G.S. inférieur, mais en période de reproduction. On pourrait penser que la vie prolongée en aquarium est anormale et ne permet pas un fonctionnement ovarien suffisant. Cependant, un développement spontané et très accentué des ovaires a pu être observé fréquemment et la ponte obtenue par injections de prolans et de cortisone (G. Mousset, 1957).

c) MURÈNES. — Toutes les murènes furent capturées en mai en Méditerranée. Les femelles, de R.G.S. 0,4, ont des concentrations en œstrogènes dans le sang circulant beaucoup plus élevées (valeur moyenne totale :  $18,9 \mu\text{g} \pm 1,9 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ ) que les mâles (valeur moyenne :  $8,0 \mu\text{g} \pm 1,9 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ ).

Cette différence porte à la fois sur l'œstrone et l'œstradiol, mais semble encore plus nette pour cette dernière substance qui est plus de trois fois plus élevée chez les femelles.

d) CARPES. — Les carpes furent étudiées en février et en octobre. On constate (tableau XXIX) au mois de février que les femelles (R.G.S. moyen 0,7) ont des concentrations en œstrogènes élevées (valeur moyenne :  $7,0 \mu\text{g} \pm 4,3 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ ), alors que les mâles ont une concentration inférieure de moitié ( $3,9 \mu\text{g} \pm 2,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ). Au mois d'octobre, en dépit d'un R.G.S. plus élevé que précédemment (3,1 en moyenne), les carpes femelles contiennent très peu d'œstrogènes (valeur moyenne :  $2,0 \mu\text{g} \pm 2,3 \mu\text{g}$  par 100 ml) et les mâles encore moins ( $1,1 \mu\text{g} \pm 1,3 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ ).

6° **Discussion.** — Les résultats que nous avons obtenus dans le sang circulant diffèrent de ceux de Dean et Chester-Jones (1959), car nous n'avons jamais pu, comme ils l'avaient fait dans les ovaires de *Protopterus annectens owen*, mettre en évidence de l'œstriol. Mais il s'agit ici de téléostéens et non de dipneustes physiologiquement très différents.

Il existe par contre une certaine concordance avec les résultats de Gallien et Chalumeau (1960) qui ont trouvé dans le sang de femelles adultes de *Xenopus laevis* Daudin  $4 \mu\text{g}$  par 100 ml d'œstrogènes avec une technique assez voisine de la nôtre. Seules les murènes possèdent dans le sang circulant des taux d'œstrogènes beaucoup plus élevés. Les concentrations œstrogéniques dans le sang circulant ne semblent généralement pas en rapport direct avec le R.G.S.

Par contre, elles semblent en rapport avec la ponte et subir des variations saisonnières correspondant à celle-ci. En effet, les taux les plus élevés furent obtenus chez les anguilles en septembre et novembre, chez les carpes en février. Les congres examinés en mai avaient également beaucoup d'œstrogènes ainsi que les murènes capturées à cette époque.

Les concentrations observées chez le mâle sont assez notables, mais ceci n'est pas pour nous surprendre, car on sait que le testicule des vertébrés sécrète des quantités importantes d'œstrogènes. Lorsqu'il nous a été possible de comparer des mâles et des femelles examinés au même moment, nous avons pu constater cependant que le sang de ces dernières était beaucoup plus riche en œstrogènes (sauf chez les congres méditerranéens).

b) *Dosage des œstrogènes dans le sang de saumon adulte* (*Salmo salar* L.) en eau douce. — Nous avons effectué en collaboration avec

M. le professeur Fontaine et T. Nomura quelques recherches sur la teneur en œstrogènes du sang de saumon à trois étapes de sa vie en eau douce :

1° peu après son entrée dans les fleuves, alors que la maturation génitale n'est pas encore apparemment commencée : saumon de montée (mars-avril) (Peyrehorade, Gaves réunis) (4 ♀, 5 ♂);

2° sur les frayères (glandes génitales mûres) : saumon frayant (décembre) (Oloron-Sainte-Marie, Gave d'Oloron) (7 ♀, 3 ♂);

3° lors de la migration catadrome (glandes génitales au repos) : saumon retournant, après la fraye, en mer, dit Mended (mars) (Sorde, Gave d'Oloron) (4 ♀, 2 ♂).

Tous les échantillons de sang ont été recueillis, par section de l'aorte caudale, sur des poissons du bassin de l'Adour. Le sang hépariné était aussitôt placé dans la neige carbonique et expédié au laboratoire où les dosages étaient effectués selon la technique précédemment décrite (voir tableau XXX).

Les conclusions qui se dégagent de ce tableau sont les suivantes :

La teneur totale en œstrogènes, faible chez le saumon de montée, s'élève considérablement chez le saumon frayant, puis diminue chez le Mended. L'œstriol ou une hormone très voisine apparaît seulement chez le saumon frayant; elle disparaît plus ou moins complètement chez le saumon Mended. A aucune des étapes envisagées, des différences liées au sexe n'apparaissent significatives.

Il est particulièrement remarquable de constater que le saumon mâle frayant peut présenter des teneurs en œstriol du sang au moins aussi élevées que la femelle au moment de la fraye, alors que dans l'espèce humaine l'œstriol n'a été signalé que chez les individus de sexe féminin.

Quels peuvent être les lieux de formation et le rôle physiologique de cet œstriol chez le saumon mâle ? Nous en sommes actuellement réduits aux hypothèses. Étant donné que, chez le mammifère femelle, l'œstriol stimule les voies génitales inférieures (col, vagin, vulve) (Puck, 1957 a), produit une glaire cervicale favorable à la survie des spermatozoïdes et que l'importance quantitative de son excrétion semble liée à l'augmentation de largeur du canal génital inférieur (R.C. Merrill, 1958), il est permis de supposer que cette substance peut jouer un rôle comparable chez le saumon mâle :

a) dans la dilatation de la voie génitale inférieure, sorte d'entonnoir constitué par la partie supra-postérieure du cœlome dont l'extrémité s'insinue entre le rectum et le méat urinaire et qui, au moment de la maturité sexuelle, étend son domaine vers l'arrière, creusant entre eux un orifice de sortie propre;

b) dans la stimulation d'une sécrétion muqueuse susceptible de prolonger la survie des spermatozoïdes — encore très brève — dans l'eau douce, fonction qui serait alors comparable à celle du liquide cœlomique de la femelle, connu pour exercer une telle action (Dorier, 1951).

TABLEAU XXX. — TENEUR EN GESTOGENES DU SANG DE SAUMON (*Salmo salar* L.).  
Valeurs moyennes exprimées en microgrammes pour 100 ml de sang.

| Stade                         | Estrone            | Œstradiol          | Œstriol           | Gestogènes<br>totaux |
|-------------------------------|--------------------|--------------------|-------------------|----------------------|
| Saumon de montée (mars-avril) |                    |                    |                   |                      |
| ♀ 4 dosages                   | 0,6 ± 0,1 (0,27) * | 0,45 ± 0,18 (0,49) | nul               | 1,10 ± 0,26 (0,7)    |
| ♂ 5 dosages                   | 0,9 ± 0,07 (0,12)  | 0,96 ± 0,49 (0,85) | nul               | 1,86 ± 0,55 (0,96)   |
| Saumon frayant (décembre)     |                    |                    |                   |                      |
| ♀ 7 dosages                   | 2,2 ± 0,3 (0,6)    | nul                | 2,9 ± 0,9 (1,8)   | 5,15 ± 1,12 (2,2)    |
| ♂ 3 dosages                   | 2,7 ± 1,3 (2,9)    | 0,9 ± 0,7 (1,7)    | 3,4 ± 2,7 (6,2)   | 7,02 ± 1,93 (4,3)    |
| Saumon Mended (mars)          |                    |                    |                   |                      |
| ♀ 4 dosages                   | 0,2 ± 0,07 (0,15)  | 0,27 ± 0,17 (0,34) | 0,9 ± 0,58 (1,15) | 1,3 ± 0,75 (1,5)     |
| ♂ 2 dosages                   | 0,25 ± 0,25 (0,35) | nul                | nul               | 0,25 ± 0,25 (0,35)   |

\*  $y \pm s$  ( $\sigma$ ) ( $y$  : moyenne ;  $s$  : écart type de la moyenne ;  $\sigma$  : déviation standard).

Nous essayons actuellement de compléter ce travail par le dosage des hormones sexuelles dans les gonades et les corpuscules de Stannius des saumons adultes en eau douce (Cedard et Fontaine, 1963).

Les corpuscules de Stannius du Saumon atlantique renferment des œstrogènes et des 17 cétostéroïdes. Alors que la teneur en œstriol est à peine doublée dans les corpuscules de Stannius de la femelle, du début de la migration anadrome à l'époque de la fraye, et que la teneur en androgènes reste approximativement la même, cette teneur en androgènes décuple dans les corpuscules de Stannius du mâle.

c) *Teneur en œstrogènes du sang de la grenouille rousse (Rana temporaria L.)*. — En collaboration avec R. Ozon nous avons recherché chez *Rana temporaria* la présence d'œstrogènes dans le sang, en nous attachant à préciser les variations de la teneur de ces substances au cours du cycle menstruel.

Le sang a été prélevé directement dans le cœur par ponction après anesthésie à l'éther et recueilli sur citrate de sodium. Les recherches ont été effectuées par notre méthode habituelle de dosage des œstrogènes sanguins sans recourir comme pour le sang de poisson à une extraction toluène-soude.

TABLEAU XXXI. — TENEUR EN ŒSTROGÈNES DU SANG DE RANA TEMPORARIA.  
Exprimée en  $\mu\text{g}$  par 100 ml de sang.

| Epoque<br>du<br>prélèvement | Nombre<br>d'animaux | Quantité<br>de sang | Œstrone | Œstradiol | Œstrone | Totaux<br>pour<br>100 ml |
|-----------------------------|---------------------|---------------------|---------|-----------|---------|--------------------------|
| Novembre<br>et<br>décembre  | 13 ♀                | 8 ml                | nul     | 0,5       | 0,3     | 0,8                      |
|                             | 11 ♀                | 11 ml               | nul     | 0,3       | 0,3     | 0,6                      |
|                             | 20 ♂                | 16 ml               | 0,4     | 0,1       | 0,2     | 0,7                      |
| Fin mars                    | 18 ♀                | 10 ml               | 0,1     | 0,4       | 0,7     | 1,2                      |
|                             | 10 ♂                | 7 ml                | nul     | 1,0       | 0,8     | 1,8                      |

Une première série d'expériences a été effectuée en novembre et décembre sur des animaux capturés en octobre. A cette époque, les gonades sont mûres et cet état dure pendant l'hibernation, jusqu'à la ponte (mars). L'expérience a porté sur 24 femelles et 20 mâles. La deuxième série d'expériences a été effectuée en mars, période de la ponte, sur des animaux capturés en octobre, ayant hiberné au laboratoire. Le sang a été prélevé chez des individus accouplés. Pour la moitié des couples, la ponte ovarique était achevée et les œufs étaient accumulés dans la partie utérine de l'oviducte. Pour les autres couples, l'ovulation n'avait pas encore eu lieu.

On encadre ainsi au mieux la période assez brève de l'accouplement et de la ponte. L'intérêt du choix de la grenouille rousse est marqué par le fait que cette espèce a un cycle reproducteur couvrant l'année entière. Les résultats de l'analyse sont rapportés dans le tableau XXXI. En novembre, la teneur totale en œstrogènes chez la grenouille est très faible. Le taux bas est à la limite inférieure de sensibilité de la technique; on remarque en particulier l'absence d'œstrone chez les femelles. Il n'y a pas de différence sensible entre mâles et femelles quant aux valeurs globales.

Par contre, au moment de la ponte, en mars, la teneur totale s'élève, en particulier pour l'œstradiol et l'œstriol. Pour ce dernier stéroïde, il est possible qu'il s'agisse d'une substance de polarité voisine. En effet, le maximum d'excitation du spectre de fluorescence est identique à celui de l'œstriol, mais le maximum d'émission est déplacé vers le visible (5.000 Å au lieu de 4.800 Å). Il s'agit vraisemblablement d'œstrogènes hydroxylés sur le carbone 6, substances déjà identifiées par quelques auteurs au cours d'expériences effectuées *in vitro* avec des préparations de foie de rat (Breuer, 1962 b).

### Conclusion

Chez *Rana temporaria*, espèce à cycle annuel, la recherche des œstrogènes montre deux états remarquables. En novembre, époque où les gonades ont atteint leur pleine maturité sexuelle, qui restera stabilisée tout l'hiver, il existe dans le sang des taux faibles d'œstrogènes. Au moment de la ponte, ce taux subit une augmentation significative aussi bien chez le mâle que chez la femelle.

*Nous avons donc pu, aussi bien chez la grenouille rousse que chez les poissons étudiés, mettre en évidence des variations de la concentration des œstrogènes, selon les saisons et les conditions physiologiques, parfois en relation directe avec la ponte.*

Il est en outre intéressant de constater que, comme Galzigna (1961) au niveau des ovaires, nous avons trouvé de l'œstriol chez le saumon et non pas chez les autres téléostéens étudiés. La faible teneur en œstrogènes sanguins ne nous a pas permis malheureusement d'apporter de preuve physico-chimique de la nature exacte des stéroïdes en cause, car l'obtention d'hormones cristallisée nécessiterait une trop grande quantité de sang. Nous cherchons actuellement à compléter ces travaux par des études *in vitro* du métabolisme des stéroïdes stables ou radio-actifs par les divers tissus afin de comparer les capacités enzymatiques de ceux-ci.

## CONCLUSION GÉNÉRALE

*On peut constater que tous les résultats que nous avons obtenus convergent vers un métabolite particulier, l'œstriol. En effet celui-ci nous a semblé dès le début de nos recherches caractéristique de la fonction lutéale et de la gestation, tant par son activité biologique très particulière que par son apparition dans le sang et son augmentation sélective dans les urines après l'ovulation.*

*Ultérieurement nous nous sommes aperçus que ce stéroïde semblait également en relation avec l'existence ou non d'un utérus fonctionnel et qu'il existait une sorte de gradient de concentration de l'ovaire à l'endomètre, le premier étant riche en œstradiol, le second en œstriol. Les expériences que nous avons effectuées, in vivo et in vitro, nous ont montré qu'il semblait s'agir dans les glandes endométriales d'une hydroxylation en C<sup>16</sup> plutôt que d'un stockage sélectif d'œstriol.*

*Nous avons également pu constater que dans le placenta humain perfusé in vitro l'œstriol avait une voie de biosynthèse tout à fait distincte de celle de l'œstrone et de l'œstradiol. Cette voie est très complexe car elle implique des échanges entre placenta et fœtus, ce dernier semblant responsable de l'hydroxylation en C<sup>16</sup> nécessaire. Une telle constatation permet de comprendre aisément pourquoi, au contraire du prégnañdiol, l'œstriol urinaire est un excellent index de la viabilité fœtale.*

*Dans un tout autre domaine nous avons pu remarquer également, que l'œstriol apparaît dans le sang circulant chez quelques vertébrés inférieurs, le saumon en particulier lors des processus de reproduction.*

---

## RÉSUMÉ

Le travail que nous présentons ne constitue pas une étude complète du métabolisme et de la biosynthèse des œstrogènes, car ce sujet atteint actuellement une trop grande ampleur. Nous avons volontairement restreint la liste des références, et laissé dans l'ombre certains aspects pourtant passionnants de ce problème, en particulier le mécanisme de l'action des œstrogènes dans l'organisme humain.

Nous nous sommes limités à exposer après un bref rappel bibliographique, les résultats que la méthode de mesure fluorimétrique des œstrogènes après chromatographie de partage nous a permis d'obtenir et à les comparer aux résultats des autres auteurs.

Nous avons d'abord, dans la PREMIÈRE PARTIE de cet ouvrage, exposé quelques notions de base concernant la structure des œstrogènes naturels, leur lieu de formation et leur mécanisme de biosynthèse ainsi que leur métabolisme dans l'organisme humain.

DANS LA DEUXIÈME PARTIE, nous avons énuméré les raisons qui nous ont amenée à effectuer le *dosage des œstrogènes sanguins* et à adopter la fluorimétrie dont l'extrême sensibilité s'adapte parfaitement aux nécessités de ce dosage. Les faibles quantités d'œstrogènes contenues dans le sang veineux périphérique ne se prêtent en effet pas aux méthodes de mesures courantes, telle que la colorimétrie. La fluorimétrie nécessite cependant une grande purification préalable des extraits. Nous avons pu constater par les vérifications techniques que nous avons entreprises que les trois fractions œstrone, œstradiol, œstriol obtenues sont d'une pureté satisfaisante.

Nous avons exposé les résultats que nous avons obtenus au cours de la grossesse normale, du cycle menstruel, de la ménopause et de quelques troubles gynécologiques, et les avons comparés aux résultats des autres auteurs et au dosage des stéroïdes urinaires.

La faible augmentation des œstrogènes sanguins observée au cours de la grossesse normale, et les écarts individuels importants en limitent la portée actuelle à une simple recherche physiologique, l'examen des œstrogènes urinaires restant préférable.

En dehors de la grossesse, nous avons pu obtenir des résultats intéressants tant dans les stérilités que dans les aménorrhées ou les métrorragies, résultats au moins aussi fructueux que ceux que la mesure des œstrogènes urinaires peut fournir.

Les dosages que nous avons effectués dans le liquide des kystes folliculaires, aussi bien que la mesure des œstrogènes dans le sang veineux ovarien, nous ont montré une prédominance de l'œstradiol dans ces liquides, très caractéristique de la sécrétion ovarienne.

Enfin le dosage des œstrogènes dans le sang veineux périphérique au cours de quelques recherches expérimentales nous a permis de mettre en évidence le rôle prépondérant de la muqueuse utérine dans la transformation de l'œstradiol d'origine exogène ou endogène en œstriol ou tout au moins en sa forme de transport, et le rôle favorisant de la progestérone au cours de ce processus. Dans les conditions physiologiques, l'association des deux facteurs semble nécessaire, puisque nous ne retrouvons normalement l'œstriol dans le sang circulant que chez les femmes enceintes ou après l'ovulation et que nous n'avons jamais pu en mettre en évidence chez l'homme ou chez la femme hystérectomisée, même en cas d'activité fonctionnelle des ovaires restants.

Nous avons également entrepris des dosages comparatifs des œstrogènes dans divers tissus humains prélevés au cours du cycle menstruel ou de la grossesse. Les dosages effectués dans les fragments d'ovaires entiers ou de corps jaunes, ainsi que dans l'endomètre et le myomètre, nous ont permis de confirmer l'opinion généralement admise que seule l'œstrone et surtout l'œstradiol sont des hormones ovariennes primitives, l'œstriol étant un produit de leur métabolisme ultérieur.

Nous avons également pu constater des variations cycliques du taux des œstrogènes dans la muqueuse utérine avec une augmentation considérable de l'œstriol libre en phase lutéale, ainsi qu'une richesse particulière en œstrogènes dans l'endomètre des femmes ayant des antécédents métrorragiques ou en période de saignement.

Nous avons pu ultérieurement identifier de façon formelle l'œstriol dans ce tissu, par divers spectres d'absorption, formation de méthyl-éther et micro-sublimation.

Nous nous sommes demandé si les taux considérables d'œstriol dans l'endomètre étaient dus à un stockage sélectif, ou à une hydroxylation directe de l'œstradiol ovarien au niveau des glandes endométriales.

Les expériences d'incubation de tranches d'endomètre avec de l'œstradiol-17 $\beta$  stable ou radio-actif ont abouti à la formation d'œstriol, mais l'incubation d'un homogénat en présence de T.P.N.H. et d'œstradiol-17 $\beta$ -6-7-H3 a été négative.

Par contre, la perfusion *in vitro* d'un utérus avec œstradiol tritié et œstradiol-16-C<sup>14</sup> a permis l'isolement dans le liquide de perfusion d'œstriol tritié, le rapport H3/C<sup>14</sup> restant constant après trois cristallisations succes-

sives. L'absence complète de tritium dans la fraction œstriol du myomètre nous semble indiquer que l'endomètre est responsable de l'hydroxylation constatée.

Nous avons également, DANS LA TROISIÈME PARTIE de cet ouvrage, exposé brièvement une *technique de perfusion de placenta humain « in vitro »* mise au point à la Maternité de Port-Royal, et les résultats que nous avons pu obtenir à l'issue de 101 perfusions.

Nous avons pu constater que le placenta ainsi maintenu en survie pendant quatre à six heures continue à libérer des œstrogènes dans le liquide de perfusion, qu'il peut transformer certains œstrogènes entre eux et surtout qu'il est capable d'aromatiser les androgènes neutres ou substitués en œstrone et en œstradiol, et de transformer directement les stéroïdes hydroxylés sur le carbone 16 en œstriol, réalisant ainsi pour la première fois la synthèse de ce stéroïde en quantité importante par un placenta entier.

Nous avons également pu constater l'action stimulante des gonadotrophines chorioniques sur certaines de ces réactions (hydroxylation en C<sup>16</sup> et en C<sup>19</sup>) et discuter d'après ces résultats le rôle respectif du fœtus et du placenta dans la biosynthèse des œstrogènes au cours de la grossesse.

ENFIN DANS LA QUATRIÈME PARTIE de ce travail, nous avons effectué un bref rappel du métabolisme des œstrogènes chez les vertébrés inférieurs et les invertébrés et cité quelques travaux que nous avons réalisés en collaboration avec les laboratoires du professeur Fontaine et du professeur Gallien sur les variations des œstrogènes sanguins au cours du cycle sexuel de certains poissons et d'un batracien.

Cette suite de travaux ne réalise évidemment pas un ensemble parfaitement cohérent et définitif, mais simplement un bilan de nos résultats et des hypothèses qu'ils suggèrent et que nous nous proposons ultérieurement de vérifier.

TABLEAU XXXII. — NOMENCLATURE SYSTÉMATIQUE ET NOMS USUELS DES STÉROÏDES  
MENTIONNÉS DANS CET OUVRAGE.

| NOMENCLATURE SYSTÉMATIQUE                                                       | NOMS USUELS                                |
|---------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Cholest-5-èn-3 $\beta$ -ol .....                                                | cholestérol.                               |
| 3 $\beta$ -hydroxy-prégn-5-ène-20-one .....                                     | prégnénolone.                              |
| 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -dihydroxy-prégn-5-ène-20 one .....                      | 17 $\alpha$ -hydroxy-prégnénolone.         |
| Prégn-4-ène-3,20-dione .....                                                    | progestérone.                              |
| 17 $\alpha$ -hydroxy-prégn-4-ène-3,20-dione .....                               | 17 $\alpha$ -hydroxy-progestérone.         |
| 3 $\beta$ -hydroxy-androst-5-ène-17-one .....                                   | déhydro-épi-androstérone.                  |
| Androst-4-ène-3,17-dione .....                                                  | androsténedione.                           |
| 17 $\beta$ -hydroxy-androst-4-ène-3-one .....                                   | testostérone.                              |
| 17 $\beta$ ,19-dihydroxy-androst-4-ène-3-one .....                              | 19-hydroxy-testostérone.                   |
| 17 $\beta$ -hydroxy-androst-4-ène-3,19-dione .....                              | 19-oxo-testostérone.                       |
| 19-hydroxy-androst-4-ène-3,17-dione .....                                       | 19-hydroxy-androsténedione.                |
| Androst-4-ène-3,17,19-trione .....                                              | 19-oxo-androsténedione.                    |
| 17,21-dihydroxy-prégn-4-ène-3,11,20-trione ..                                   | cortisone.                                 |
| 11 $\beta$ ,17,21-trihydroxy-prégn-4-ène-3,20-dione ..                          | cortisol (hydrocortisone).                 |
| Androst-4-ène-3,11,17-trione .....                                              | 11-oxo-androsténedione.                    |
| 11 $\beta$ -hydroxy-androst-4-ène-3,17-dione .....                              | 11 $\beta$ -hydroxy-androsténedione.       |
| 11 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-androst-4-ène-3-one .....                     | —                                          |
| Androst-5-ène-3 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol .....                   | —                                          |
| 16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-androst-4-ène-3-one .....                    | 16 $\alpha$ -hydroxy-testostérone.         |
| 16 $\alpha$ -hydroxy-androst-4-ène-3,17-dione .....                             | 16 $\alpha$ -hydroxy-androsténedione.      |
| 3-hydroxy-œstra-1,3,5(10),6,8(9)-pentaène-17-one .....                          | équilénine.                                |
| 3-hydroxy-œstra-1,3,5(10)-triène-17-one .....                                   | œstrone.                                   |
| 3-hydroxy-œstra-1,3,5(10)-triène-6,17-dione ..                                  | 6-oxo-œstrone.                             |
| 3-hydroxy-œstra-1,3,5(10)-triène-16,17-dione ..                                 | 16-oxo-œstrone.                            |
| œstra-1,3,5(10)-triène-3,17 $\beta$ -diol .....                                 | 17 $\beta$ -œstradiol (œstradiol).         |
| 2,3-dihydroxy-œstra-1,3,5(10)-triène-17-one ..                                  | 2-hydroxy-œstrone.                         |
| 2,3-dihydroxy-œstra-1,3,5(10)-triène-17-one-2-méthyl-éther .....                | 2-méthoxy-œstrone.                         |
| 3,6 $\beta$ -dihydroxy-œstra-1,3,5(10)-triène-17-one ..                         | 6 $\beta$ -hydroxy-œstrone.                |
| 3,6 $\alpha$ -dihydroxy-œstra-1,3,5(10)-triène-17-one ..                        | 6 $\alpha$ -hydroxy-œstrone.               |
| 3,11 $\beta$ -dihydroxy-œstra-1,3,5(10)-triène-17-one ..                        | 11 $\beta$ -hydroxy-œstrone.               |
| 3,16 $\beta$ -dihydroxy-œstra-1,3,5(10)-triène-17-one ..                        | 16 $\beta$ -hydroxy-œstrone.               |
| 3,16 $\alpha$ -dihydroxy-œstra-1,3,5(10)-triène-17-one ..                       | 16 $\alpha$ -hydroxy-œstrone.              |
| 3,17 $\beta$ -dihydroxy-œstra-1,3,5(10)-triène-6-one ..                         | 6-oxo-œstradiol.                           |
| 3,17 $\beta$ -dihydroxy-œstra-1,3,5(10)-triène-16-one ..                        | 16-oxo-17 $\beta$ -œstradiol.              |
| 3,18 $\beta$ -dihydroxy-œstra-1,3,5(10)-triène-17-one ..                        | 18-hydroxy-œstrone.                        |
| œstra-1,3,5(10)-triène-3,11 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol .....                    | 11 $\beta$ -hydroxy-17 $\beta$ -œstradiol. |
| œstra-1,3,5(10)-triène-2,3,17 $\beta$ -triol .....                              | 2-hydroxy-17 $\beta$ -œstradiol.           |
| œstra-1,3,5(10)-triène-2,3,17 $\beta$ -triol-2-méthyl-éther .....               | 2-méthoxy-17 $\beta$ -œstradiol.           |
| œstra-1,3,5(10)-triène-3,6 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol .....                     | 6 $\beta$ -hydroxy-17 $\beta$ -œstradiol.  |
| œstra-1,3,5(10)-triène-3,16 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol .....                    | 16-épi-œstriol.                            |
| œstra-1,3,5(10)-triène-3,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol .....                   | œstriol.                                   |
| œstra-1,3,5(10)-triène-3,16 $\beta$ ,17 $\alpha$ -triol .....                   | 16,17-épi-œstriol.                         |
| œstra-1,3,5(10)-triène-3-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -triol .....                  | 17-épi-œstriol.                            |
| œstra-1,3,5(10)-triène-2,3,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tétrol .....                | 2-hydroxy-œstriol.                         |
| œstra-1,3,5(10)-triène-2,3,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tétrol-2-méthyl-éther ..... | 2-méthoxy-œstriol.                         |

## BIBLIOGRAPHIE

- ADLERCREUTZ (H.). — *Acta Endocrin. (Kbh)*, suppl<sup>1</sup> **72**, 1962.
- AINSWORTH (L.), CARTER (A.L.) et COMMON (R.H.). — *Canad. J. Biochem. and Physiol.*, **40**, 123, 1962 a.
- AINSWORTH (L.), COMMON (R.H.). — *Nature (G.-B.)*, **195**, 77, 1962 b.
- AITKEN (E.H.), PREEDY (J.R.K.). — *Biochem. J.*, **62**, 15 p., 1956.
- AITKEN (E.H.), PREEDY (J.R.K.), ETON (B.) et SHORT (R.V.). — *The Lancet*, 1096, 1958.
- ALBERT (S.), HEARD (R.D.H.), LEBLOND (C.P.) et SAFFRAN (J.). — *J. Biol. Chem.*, **177**, 247, 1949.
- ALBRIEUX (A.S.). — *J. Clin. Endocr.*, **1**, 889, 1941 a.
- ALBRIEUX (A.S.). — *J. Clin. Endocr.*, **1**, 893, 1941 b.
- ALLEN (W.H.). — *J. Clin. Endocr.*, **10**, 71, 1950.
- ALLEN (E.) et DOISY (A.). — *J. Amer. Med. Ass.*, **81**, 819, 1923.
- ALLEN (E.), PRATT (J.P.) et DOISY (E.A.). — *J. Amer. Med. Ass.*, **85**, 399, 1925.
- ALLEN (E.), PRATT (J.P.), NEWELL (Q.V.) et BLAND (L.J.). — *Amer. J. Physiol.*, **92**, 127, 1930.
- ALLOITEAU (J.J.) et ACKER (G.). — *C.R. séances Acad. Sciences*, **250**, 1566, 1960.
- ATNER (J.) et GITSCH (E.). — *Geburtsch un Frauenheilk*, **19**, 812, 1959.
- ASCHEIM (S.) et ZONDEK (B.). — *Klin. Wschr.*, **7**, **1**, 8, 1928.
- AXELROD (L.R.). — *J. Biol. Chem.*, **201**, 59, 1953.
- AXELROD (L.R.), NARASIMHA (R.A.O.) et GOLDZIEHER (J.W.). — *Arch. Biochem. Biophys. (U.S.A.)*, **94**, 265, 1961.
- AXELROD (L.R.) et GOLDZIEHER (J.W.). — *J. Clin. Endocr.*, **22**, 537, 1962 b.
- AXELROD (L.R.) et GOLDZIEHER (J.W.). — *Endocrinology*, **70**, 943, 1962 b.
- AXELSON (E.) et DICZFALUSY (E.). — *Rec. Trav. chim. Pays-Bas*, **80**, 971, 1961.
- BAGGET (B.), ENGEL (L.L.), BALDERAS (L.), LANMAN (G.), SAVARD (K.) et DORFMAN (R.I.). — *Endocrinology*, **64**, 600, 1959.
- BARTON (G.M.), EVANS (R.S.) et GARDNER (J.A.F.). — Paper chromatography of phenolic substances. *Nature*, **170**, 249, 1952.
- BAULD (W.S.). — *Biochem. J.*, **63**, 488, 1956.
- BAULD (W.S.), GIVNER (M.L.), ENGEL (L.L.) et GOLDZIEHER (J.W.). — *Canad. J. Biochem. and Physiol.*, **38**, 213, 1960.
- BAULD (W.S.) et GREENWAY (R.M.). — *In methods of biochemical analysis* (vol. 5), p. 337, 1957. D. Glick, édit., New York : Interscience Publ.
- BAULIEU (E.E.), WALLACE (E.) et LIEBERMAN (S.). — *J. Biol. Chem.*, **238**, 1316, 1963.
- BAULIEU (E.E.) et DRAY (F.). — *J. Clin. Endocr.*, **23**, 1298, 1963.
- BAUM (F.), KREKELER (E.) et STENGELE (J.). — *Klinische Wochenschrift*, **35**, 85, 1957.
- BEALL (D.). — *Nature (Lond.)*, **144**, 76, 1939.
- BEALL (D.). — *Biochem. J.*, **34**, 1293, 1940.
- BEER (C.T.) et GALLAGHER (T.F.). — *J. Biol. Chem.*, **214**, 335, 1955 a.

- BEER (C.T.) et GALLAGHER (T.F.). — *J. Biol. Chem.*, **214**, 351, 1955 b.
- BELING (C.G.). — *Acta Endocr.* (Kbh), suppl<sup>t</sup> 79, 1963.
- BELING (C.G.), BREUER (J.A.) et BREUER (H.). — *Acta Endocr.* (Kbh), **43**, 87, 1963.
- BISCHOFF (F.), TURNER (J.G.) et BRYSON (G.). — *Am. J. Physiol.*, **195**, 81, 1958.
- BISCHOFF (F.) et STAUFFER (R.D.). — *Am. J. Physiol.*, **191**, 313, 1957.
- BISCHOFF (F.) et BRYSON (G.). — *J. Applied Physiol.*, **15**, 515, 1960.
- BOLTÉ (E.), MANCUSO (S.), ERIKSSON (G.), WIKVIST (N.) et DICZFALUSY (E.). — *Acta Endocrin.* (Kbh), **45**, 535, 1964 a; **45**, 560, 1964 b; **45**, 576, 1964 c.
- BORGLIN (N.E.). — *Acta Obst. et Gynecol. Scandin.*, **38**, 157, 1959.
- BORTH (R.). — *In Ciba Found. Colloquia on Endocrinology*, **2**, 45, 1952.
- BRAUNSBURG (H.) et OSBORN (S.B.). — *Anal Chim. Acta* (Amsterdam), **6**, 84, 1952.
- BREUER (H.). — *Acta Endocr.* (Kbh), suppl<sup>t</sup> 67, IV<sup>e</sup> Congrès Acta Endocr., 31, 1962 a.
- BREUER (H.). — *Vitamines and hormones*, **XX**, 285, 1962 b. Academic Press. New York.
- BREUER (H.). — Internationales Symposium der Gynakologischen Endokrinologie, Berlin, mai 1963.
- BREUER (H.) et GRILL (P.). — *Hoppe-Seyler's. Z. Physiol. Chem.*, **324**, 254, 1961.
- BREUER (H.) et KASSAU (E.). — I<sup>er</sup> Congrès Intern. Acta Endocrin. (Kbh), suppl<sup>t</sup> 51, 1113, 1960.
- BREUER (H.) et KNUPPEN (R.). — *Bioch. Biophys. Acta*, **39**, 408, 1960 a.
- BREUER (H.), KNUPPEN (R.) et NOCKE (L.). — *Acta Endocr.* (Kbh), **30**, 247, 1959 a.
- BREUER (H.), KNUPPEN (R.) et NOCKE (L.). — *Biochem. J.*, **71**, 26 p., 1959 b.
- BREUER (H.), KNUPPEN (R.) et PANGELS (G.). — *Hoppe-Seyler's. Z. Physiol. Chem.*, **321**, 57, 1960 b.
- BREUER (H.), NOCKE (L.) et KNUPPEN (R.). — *Hoppe-Seyler's. Z. Physiol. Chem.*, **315**, 72, 1959 c.
- BREUER (H.), KNUPPEN (R.) et PANGELS (G.). — *Biochem. J.*, **79**, 32 p., 1961 a.
- BREUER (H.), NOCKE (L.) et PANGELS (G.). — *Acta Endocr.* (Kbh), **34**, 359, 1960 c.
- BREUER (H.), NOCKE (L.) et BAYER (J.M.). — III<sup>e</sup> Congrès Acta Endocrinol. (Leyden), suppl<sup>t</sup> 38, 69, 1958 a.
- BREUER (H.) et NOCKE (L.). — *Acta Endocr.* (Kbh), **29**, 489, 1958 b.
- BREUER (H.), OZON (R.) et MITTERMAYER (G.). — *Hoppe-Seyler's. Zeitsch. für Phys. Chem.*, **333**, 272, 1963.
- BREUER (H.), PANGELS (G.) et KNUPPEN (R.). — *J. Clin. Endocr.*, **21**, 1331, 1961 b.
- BREUER (H.) et PANGELS (G.). — *Hoppe-Seyler's. Z. Physiol. Chem.*, **322**, 177, 1961 c.
- BRYSON (M.J.), DOMINGUEZ (O.V.), KAISER (I.H.), SAMUELS (L.T.) et SWEAT (M.L.). — *J. Clin. Endocr.*, **22**, 773, 1962.
- BROWN (B.T.), FISHMAN (J.) et GALLAGHER (T.F.). — *Nature* (Lond.), **182**, 50, 1958.
- BROWN (C.H.), SAFFAN (B.D.) et PREEDY (J.R.K.). — *J. Clin. Invest.*, **39**, 975, 1960.
- BROWN (J.B.). — *Biochem. J.*, **60**, 185, 1955.
- BROWN (J.B.). — *J. Endocrinol.* (G.-B.), **16**, 202, 1957.
- BROWN (J.B.), BULBROOK (R.D.) et GREENWOOD (F.C.). — *J. Endocrin.*, **16**, 41, 1957 a.
- BROWN (J.B.), BULBROOK (R.D.) et GREENWOOD (F.C.). — *J. Endocrin.*, **16**, 49, 1957 b.
- BROWN (J.B.), FALCONER (C.W.A.) et STRONG (J.A.). — *J. Endocr.*, **19**, 52, 1959.
- BROWN (J.B.), FISHMAN (J.), HELLMAN et GALLAGHER (T.F.). (1959). — Cité in *J. Obst. Gynecol. Brit. Empire* (Congrès de Cardiff), **66**, 795, 1959.
- BROWN (J.B.), KELLAR (R.) et MATTHEW (C.D.). — *J. Obst. et Gynecol. Brit. Empire*, **66**, 177, 1959.
- BROWN (J.B.) et MARRIAN (G.F.). — *J. Endocr.* (G.-B.), **15**, 307, 1957.
- BROWN (J.B.) et MATTHEW (C.D.). — *Recent Progress in Hormon Research*, **18**, 337, 1962.

- BROWNE (J.S.L.). — Cité par J.B. Collip dans : *Proc. Calif. Acad. Med.*, **1**, 38, 1930.
- BULBROOK (R.D.) et GREENWOOD (F.C.). — *Brit. Med. J.*, **1**, 662, 1957.
- BULBROOK (R.D.), HADFIELD (G.J.) et SCOWEN (E.F.). — *Brit. Med. J.*, **11**, 7, 1958.
- BURNSTEIN (S.) et LEENHARDT (R.H.). — *J. Org. Chem.*, **18**, 1146, 1953.
- BUTENANDT (A.). — *Naturwissenschaften*, **17**, 879, 1929.
- CALLOW (N.H.), CALLOW (R.K.) et EMMENS (C.W.). — *J. Endocrin.*, **1**, 99, 1939.
- CANTAROW (A.), PASHKIS (K.E.), RAKOFF (A.E.) et HANSEN (L.P.). — *Endocrinology*, **33**, 309, 1943.
- CARCATZOULIS (S.). — *Presse Médicale*, **69**, 2063, 1961 a.
- CARCATZOULIS (S.). — *Presse Médicale*, **69**, 2375, 1961 b.
- CARPENTER (J.G.D.) et KELLIE (A.E.). — *Biochem. J.*, **84**, 303, 1962.
- CASSMER (O.). — *Acta Endocr. (Kbh)*, suppl<sup>t</sup> **45**, 1959.
- CEDARD (L.). — *Sem. des Hôp. Path. et Biol.*, **8**, n° 9, 901, 1960.
- CEDARD (L.) et DICZFALUSY (E.). — Cité par DICZFALUSY in *Aktuelle Probleme der Hepatologie*, p. 154 (G.A. Martini, éd.), Thieme, Stuttgart, 1962.
- CEDARD (L.), FILLMAN (B.), KNUPPEN (R.), LISBOA (B.), BREUER (H.). — *Hoppe-Seyler's. Z. physiol. chem.* (1964), sous presse.
- CEDARD (L.), FONTAINE (M.) et NOMURA (T.). — *C.R. Séances Acad. Sciences*, **252**, 2656, 1961.
- CEDARD (L.), FONTAINE (M.). — *C.R. séances Ac. Sciences*, **257**, 3095, 1963.
- CEDARD (L.), GRANJON (A.) et VARANGOT (J.). — *C.R. Séances Soc. Biol.*, **156**, 1764, 1962.
- CEDARD (L.) et OZON (R.). — *C.R. Séances Soc. Biologie*, **156**, 1805, 1962.
- CEDARD (L.) et NOMURA (T.). — *Bull. Inst. Océanog.*, Monaco, n° 1196, 1961.
- CEDARD (L.), VARANGOT (J.) et YANNOTTI (S.). — *C.R. Séances Ac. Sciences*, **254**, 1870, 1962 a.
- CEDARD (L.), VARANGOT (J.) et YANNOTTI (S.). — *C.R. Séances Ac. Sciences*, **254**, 3896, 1962 b.
- CEDARD (L.), VARANGOT (J.) et YANNOTTI (S.). — *C.R. Séances Ac. Sciences*, **257**, 2725, 1963.
- CEDARD (L.), VARANGOT (J.), YANNOTTI (S.). — *C.R. séances Ac. Sciences*, **258**, 3769, 1964.
- CEDARD (L.), YANNOTTI (S.) et VARANGOT (J.). — *C.R. Séances Soc. Biol.*, **155**, 458, 1961.
- CLAESSON (L.) et HILLARP (N.A.). — *Acta Physiol. Scand.*, **13**, 115, 1947.
- CHANG (E.) et DAO (T.L.). (1959). — In *Diczfalusy et Lauritzen*, 1961.
- CHANG (E.) et DAO (T.L.). — *J. Clin. Endocr.*, **21**, 624, 1961.
- CHANG (E.) et DAO (T.L.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **57**, 609, 1962.
- CHIEFFI (G.) et LUPO (C.). — *Nature*, **190**, 169, 1961.
- CHIEFFI (G.) et LUPO (C.). — *Gen. and. Comp. Endocrinology*, **3**, 149, 1963.
- CLARK (A.J.) et BLOCH (K.). — *J. Biol. Chem.*, **234**, 2578, 1959.
- CLAUBERG (C.). — In W. STOCKER, *Handbuch der Gynäkologie*, Bd IX, p. 109, München : Bergmann, 1936.
- COHEN (H.), BATES (R.W.). — *Endocrinology*, **45**, 86, 1949.
- COHEN (S.L.) et MARRIAN (G.F.). — *Biochem. J.*, **30**, 57, 1936.
- COLAS (A.), Le ROY HENRICHS (W.), TATUM (H.J.). — *Steroids*, **3**, 417, 1964.
- CORNER (G.W.). — *The hormones in human reproduction*. Princeton : University Press, 1947.
- COURCY (C. de). — *J. Endocrinol. (G.-B.)*, **14**, 164, 1956.
- COYLE (M.G.). — *J. Endocrinol. (G.-B.)*, **25**, n° 1, VIII, 1962.
- CREPY (O.). — *Scand. Arch. Physiol.*, **1**, 427, 1947.

- DALE (E.). — *Gen. and Comp. Endocrinology*, **2**, 171, 1962.
- DANCIS (J.), MONEY (W.L.), CONDON (C.P.) et LEVITZ (M.). — *J. Clin. Invest.*, **37**, 1373, 1958.
- DAO (T.L.Y.). — *Science*, **118**, 21, 1953.
- DAVID (K.). — *Acta Brev. Neerl. Physiol.*, **4**, 64, 1934.
- DEAN (F.D.) et CHESTER-JONES (I.). — *J. Endocrinol. (G.-B.)*, **18**, 366, 1959.
- DECLERK (P.). — *Bull. Soc. Roy. Belge Gynec. et Obstét.*, **26**, 493, 1956.
- DE MEIO (R.H.), LEWYCKA (C.), WIZERKANIVK (H.) et SALCIUNAS (O.). — *Biochem. J.*, **68**, 1, 1958.
- DE PAEPE (J.C.). — *Nature (Lond.)*, **185**, 264, 1960.
- DICZFALUSY (E.). — *Acta Endocr. (Kbh)*, suppl<sup>e</sup> **12**, XII, 1953.
- DICZFALUSY (E.). — *Acta Endocr. (Kbh)*, **15**, 317, 1954.
- DICZFALUSY (E.). — *Bul. Soc. Roy. Belge Gyn. et Obst.*, **28**, 459, 1958.
- DICZFALUSY (E.), BARR (M.) et LIND (J.). — *Acta Endocr. (Kbh)*, **46**, 511, 1964.
- DICZFALUSY (E.), CASSMER (O.), ALONSO (C.) et MIQUEL (M.). — *Rec. Prog. in Horm. Research*, **17**, 147, 1961 b.
- DICZFALUSY (E.), FRANKSSON (C.) et MARTINSEN (B.). — *Acta Endocr. (Kbh)*, **38**, 59, 1961 a.
- DICZFALUSY (E.), FRANKSSON (C.), LISBOA (B.P.) et MARTINSEN (B.). — *Acta Endocr. (Kbh)*, **40**, 537, 1962.
- DICZFALUSY (E.) et HALLA (M.). — *Acta Endocr. (Kbh)*, **27**, 303, 1958.
- DICZFALUSY (E.) et LAURITZEN (C.). — *Östrogene Beim Menschen*. Springer-Verlag. Berlin, Göttingen-Heidelberg, 1961.
- DICZFALUSY (E.) et LINDKVIST (P.). — *Acta Endocr. (Kbh)*, **22**, 203, 1956.
- DICZFALUSY (E.) et MAGNUSSON (A.M.). — *Acta Endocr. (Kbh)*, **28**, 169, 1958.
- DICZFALUSY (E.), MENINI (E.), TILLINGER (K.G.) et WESTMAN (A.). — *Acta Endocr. (Kbh)*, **30**, 539, 1959.
- DICZFALUSY (E.) et MUNSTERMANN (A.M.). — *Acta Endocr. (Kbh)*, **32**, 195, 1959.
- DICZFALUSY (E.) et WESTMAN (A.). — *Acta Endocr. (Kbh)*, **21**, 321, 1956.
- DINGEMANSE (E.) et MUHLBOCK. — *Nature (Lond.)*, **141**, 927, 1938.
- DODSON (R.M.) et MUIR (R.D.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, **83**, 4627, 1961.
- DOHAN (F.C.), ROSE (E.), EIMAN (J.W.), RICHARDSON (E.M.) et ZINTEL (H.). — *J. Clin. Endocr.*, **13**, 415, 1953.
- DOISY (E.A.), LEVIN (L.) et CURTIS (J.M.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.)*, **28**, 88, 1930.
- DOISY (E.A.), VELLER (C.D.) et THAYER (S.A.). — *Amer. J. Physiol.*, **90**, 329, 1929.
- DONAHUE (J.K.). — *Endocrinology*, **27**, 149, 1940.
- DONAHUE (J.K.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **69**, 179, 1948.
- DORFMAN (R.I.) et HAMILTON (J.B.). — *Endocrinology*, **25**, 33, 1939.
- DORFMAN (R.I.), WISE (J.) et VAN WAGENEN (G.). — *Endocrinology*, **36**, 347, 1945.
- DORIER (A.). — *Trav. Lab. Hydrobiol. Pisc. Univ.*, **41**, 69, 1951.
- DUTTON (G.B.) et STOREY (I.D.E.). — *Biochem. J.*, **57**, 275, 1954.
- EDWARD (M.). — *J. Reprod. Fertil (G.B.)*, **4**, 93, 1962.
- ENGEL (L.L.), BAGGETT (B.) et CARTER (P.). — *Endocrinology*, **61**, 113, 1957.
- ENGEL (L.L.), BAGGETT (B.), CARTER (P.) et HALLA (M.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **30**, 435, 1958.
- ENGEL (L.L.), BAGGETT (B.) et HALLA (M.). — *Endocrinology*, **70**, 907, 1962.
- ENGEL (L.L.), SLAUNWHITE JR. (W.R.), CARTER (P.), EKMAN (G.), OLMSTED (P.C.) et NATHANSON (I.T.). — *Ciba Found. Coll. on Endocrinology*, **2**, 104, 1952.
- ERLANGER (B.F.), BOREK (F.), BEISER (S.M.) et LIEBERMAN (S.). — *J. Biol. Chem.*, **234**, 1090, 1959.
- FALCK (B.). — *Acta Endocr. (Kbh)*, **12**, 115, 1953.

- FINKELSTEIN (M.). — *Nature* (Londres), **168**, 830, 1951.
- FINKELSTEIN (M.). — *Acta Endocrin.* (Kbh), **10**, 149, 1952.
- FISH (W.R.) et DORFMAN (R.I.). — *J. Biol. Chem.*, **140**, 83, 1941.
- FISH (W.R.) et DORFMAN (R.I.). — *J. Biol. Chem.*, **143**, 15, 1942.
- FISHMAN (W.H.). — *Advanc. in Enzymology*, **16**, 361, 1955.
- FISHMAN (J.). — *J. Clin. Endocrin.*, **23**, 207, 1963.
- FISHMAN (J.), BRADLOW (H.L.) et GALLAGHER (T.F.). — *J. Biol. Chem.*, **235**, 3104, 1960 a.
- FISHMAN (J.), BROWN (J.B.), HELLMAN (L.), ZUMOFF (B.) et GALLAGHER (T.F.). — *J. Biol. Chem.*, **237**, 1489, 1962.
- FISHMAN (J.), COX (R.I.) et GALLAGHER (T.F.). — *Arch. Biochem.*, **90**, 318, 1960 b.
- FISHMAN (J.) et GALLAGHER (T.F.). — *Arch. Biochem.*, **77**, 511, 1958.
- FOTHERBY (K.), COLAS (A.), ATHERDEN (S.M.) et MARRIAN (G.E.). — *Biochem. J.*, **66**, 664, 1957.
- FRANDSEN (V.A.). — *Acta Endocr.* (Kbh), **31**, 603, 1959.
- FRANDSEN (V.A.) et STAKEMANN (G.). — *Acta Endocr.* (Kbh), **38**, 383, 1961.
- FRANDSEN (V.A.) et STAKEMANN (G.). — *Acta Endocr.* (Kbh), **44**, 183, 1963.
- FRANK (R.T.). — *The female sex hormones*. Springfield : Thomas Publ., 1929.
- FURUHJELM (M.). — *Acta Endocr.* (Kbh), **17**, 85, 1954.
- GALLIEN (L.) et CHALUMEAU-LE FOULGOC (M.T.). — *C.R. Séances Acad. Sciences*, **251**, 460, 1960.
- GALLIEN (L.) et LE FOULGOC (M.T.). — *C.R. Séances Acad. Sciences*, **247**, 1776, 1958.
- GALZIGNA (L.). — *Lincei. Rend. Sc. Fis. Mat. e Nat. Ital.*, **31**, 92, 1961.
- GEMZELL (C.A.), DICZFALUSY (E.) et TILLINGER (G.). — *Acta Obstetr. Gynec. Scand.*, **38**, 465, 1959.
- GERLI. — *Arch. di Ostetr. Ginecol.* (Naples), **64**, 50, 1959.
- GILLMAN (J.) et SMYTH (G.S.). — *S-Afr. J. Med. Sci.*, **4**, 36, 1936.
- GIORGI (E.P.). — *J. Endocrin.* (G.-B.), **27**, 225, 1963.
- GLIMM (E.) et WADEHN (F.). — *Biochem. Z.*, **207**, 361, 1929.
- GLUCKMAN (J.). — *S-Afr. J. Med. Sci.*, **6**, 82, 1941.
- GOLDZIEHER (J.W.) et ROBERTS (I.S.). — *J. Clin. Endocr.*, **12**, 143, 1952.
- GORDON (E.E.) et VILLEE (C.A.). — *Endocrinology*, **58**, 150, 1956.
- GOSPODAROWICZ (D.) et LEGAULT-DEMARE (J.). — *Acta Endocr.* (Kbh), **42**, 498, 1963.
- GOTTFRIED (H.), HUNT (S.V.), SIMPSON (T.H.) et WRIGHT (R.S.). — *J. Endocrinol.* (G.-B.), **24**, 425, 1962.
- GRANJON (A.), YANNOTTI (S.) et CEDARD (L.). — *C.R. Séances Soc. Biol.*, **152**, 1695, 1958.
- GRANJON (A.), YANNOTTI (S.) et CEDARD (L.). — *Presse Médicale*, 69<sup>e</sup> année, 2191, 1961.
- GRAY (C.L.) et BISCHOFF (F.). — *Amer. J. Physiol.*, **180**, 279, 1955.
- GUAL (C.), MORATO (T.), HAYANO (M.), GUT (M.) et DORFMAN (R.I.). — *Endocrinology*, **71**, 920, 1962.
- HAGOPIAN (M.). — *Study of oestrogen metabolism*. These Worcester / Mass., 1955.
- HALBAN (J.). — *Arch. Gynäk.*, **75**, 353, 1905.
- HARDY (J.D.), WARD (V.B.), TURNER (M.D.) et SAMPSON (L.P.). — *Surg. Forum*, **8**, 109, 1957.
- HARTIALA (K.J.W.). — *Ann. Méd. Exp. Fenn.*, **33**, 239, 1955.
- HASHIMOTO (Y.) et NEEMAN (M.). — *J. Biol. Chem.*, **238**, 1273, 1963.
- HAYANO (H.), LONGCHAMPT (J.E.), KELLY (W.), GUAL (C.) et DORFMAN (R.I.). — *Acta Endocr.* (Kbh), suppl<sup>e</sup> **51**, 699, 1960. I<sup>er</sup> Congrès International Acta Endocr. (Kbh).

- HAYNES (R.C. Jr.), MIKHAÏL (G.), ERIKSSON (G.), WIKVIST (N.) et DICZFALUSY (E.). — *Acta Endocrin.* (Kbh), **45**, 297, 1964.
- HEARD (R.D.H.), BAULD (W.S.) et HOFFMAN (M.M.). — *J. Biol. Chem.*, **141**, 709, 1941 b.
- HEARD (R.D.H.) et HOFFMAN (M.M.). — *J. Biol. Chem.*, **138**, 651, 1941 a.
- HEARD (R.D.H.), JACOBS (R.), O'DONNEL (V.J.), PERON (F.G.), SAFFRAN (J.C.), SOLOMON (S.S.), THOMPSON (L.M.), WILLOUGHBY (H.) et YATES (C.H.). — *Recent Prog. Hormone Research*, **9**, 383, 1954 a.
- HEARD (R.D.H.), JELLINCK (P.H.) et O'DONNEL (V.J.). — *Endocrinology*, **57**, 200, 1955.
- HEARD (R.D.H.) et O'DONNEL (V.J.). — *Endocrinology*, **54**, 209, 1954 b.
- HEARD (R.D.H.), BLIGH (E.G.), CANN (M.C.), JELLINCK (P.H.), O'DONNEL (V.J.), RAO (B.G.) et WEBB (J.L.). — *Recent. Prog. Hormone Research*, **12**, 45, 1956.
- HECKER (E.). — *Chemiker Ztg*, **88**, 588, 1958.
- HELLER (C.G.), HELLER (E.J.). — *Endocrinology*, **32**, 64, 1943.
- HEUSGHEM (C.). — *Contribution à l'étude analytique et biochimique des œstrogènes naturels*. Masson, édit., Paris, 1957
- HEUSGHEM (C.) et VERLY (W.). — *Rapport III<sup>e</sup> Congrès Endocrinol. langue franç.* Bruxelles, 1955. Masson, édit., Paris.
- HEUSGHEM (C.). — *Rev. Int. Hépatologie*, **9**, 329, 1959.
- HISAW (F.L.). — In *Control of ovulation*. Pergamon Press, 51, 1961.
- HOBKIRK (R.). — *J. Clin. Endocrin.*, **23**, 279, 1963.
- HOBKIRK (R.) et NILSEN (M.). — *J. Clin. Endocrin.*, **22**, 134, 1962.
- HOBKIRK (R.) et NILSEN (M.). — *J. Clin. Endocrin.*, **23**, 274, 1963.
- HOLLANDER (N.). — *Endocrinology*, **71**, 723, 1962.
- HORNING (E.C.), LYYKAINEN (T.), HAAHTI (E.O.A.), CREECH (B.G.) et VANDENHEUVEL (W.J.A.). — *Rec. Prog. in Horm. Research*, **19**, 57, 1963.
- HOSKINS (W.J.), COFFMAN (J.R.), KOCH (F.C.) et KENYON (A.T.). — *Endocrinology*, **24**, 702, 1939.
- HUBER (D.) et de WATTEVILLE (H.). — *Biochem. J.*, **4**, 609, 1947.
- HUFFMAN (M.N.), MAC CORQUODALE (D.W.), THAYER (S.A.), DOISY (E.A.), SMITH (G.V.) et SMITH (O.W.). — *J. Biol. Chem.*, **134**, 591, 1940.
- HUFFMAN (M.N.) et GROLLMAN (A.). — *Endocrinology*, **41**, 12, 1947.
- HURST (R.O.), KUKSIS (A.) et BENDELL (J.F.). — *Canad. J. Bioch. and Physiol.*, **35**, 637, 1957.
- ICHI (S.), FORCHIELLI (E.), PERLOFF (W.H.) et DORFMAN (R.I.). — *Analytical Biochemistry*, **5**, 422, 1963.
- ITTRICH (G.). — *Hoppe-Seyler's. Z. Physiol. Chem.*, **312**, 1, 1958.
- ITTRICH (G.). — *Hoppe-Seyler's. Z. Physiol. Chem.*, **320**, 103, 1960 a.
- ITTRICH (G.), JAKOBOVITZ (A.) et IGEL (H.). — *Zentralblatt für Gynäkologie*, **46**, 1172, 1960 b.
- JARABAK (J.), ADAMS (J.A.), WILLIAMS-ASHMAN (H.G.) et TALALAY (P.). — *J. Biol. Chem.*, **237**, 345, 1962.
- JAYLE (M.F.). — *Analyse des stéroïdes hormonaux*. Masson, édit., Paris, 1962.
- JAYLE (M.F.), BAULIEU (E.E.), SCHOLLER (R.), LISBOA (B.P.) et SAVOIE (J.C.). — *Rev. Franç. Etud. Clin. Biol.*, **3**, 455, 1958.
- JAYLE (M.F.), DECOURT (J.) et DOUMIC (J.). — *Ann. Endocr.*, **20**, 617, 1959.
- JAYLE (M.F.), GUEGUEN (I.), VALLIN (Y.) et VEYRIN-FORRER (F.). — *Presse Médicale*, **64**, 1965, 1956.
- JAYLE (M.F.) et PUJOL (J.). — *Thérapie Paris*, **16**, 849, 1961.
- JAYLE (M.F.), SCHOLLER (R.) et BÈGUE (J.). — *Excepta Medica. International Congress*, series n° 51, *Abstract*, n° 406, Milan, 1962.
- JENSEN (E.V.) et JACOBSON (H.I.). — *Rec. Prog. in Horm. Research*, **18**, 387, 1962.
- JENSEN (H.), LARIVIÈRE (M.) et ELIE (J.J.). — *Rev. Canad. Biol.*, **4**, 535, 1945.

- KAUFMAN (C.) et ZANDER (J.). — *Klin. Wschr.*, **34**, 7, 1956.
- KECKES (L.), MUTSCHLER (F.), THAN (E.) et FARKAS (I.). — *Acta Endocrin. (Kbh)*, **39**, 483, 1962.
- KELLER (M.). — *Bull. Féd. Soc. Gynéc. Obst. Franç.*, **13 bis**, 356, 1961.
- KING (R.J.B.). — *Biochem. J.*, **76**, 7 p., 1960.
- KING (R.J.B.). — *Biochem. J.*, **79**, 355, 1961.
- KNUPPEN (R.) et BREUER (H.). — *Biochem. Biophys. Acta*, **58**, 147, 1962.
- KRAYCHY (S.) et GALLAGHER (T.F.). — *J. Biol. Chem.*, **229**, 519, 1957.
- KRICHEVSKY (B.) et GLASS (S.I.). — *Endocrinology*, **41**, 196, 1947.
- KUSHINSKY (S.), DEMETRIOU (J.A.), WU (J.) et NASUTAVICUS (W.). — *J. Clin. Endocr.*, **20**, 719, 1960.
- LANGER (L.J.) et ENGEL (L.L.). — *J. Biol. Chem.*, **233**, 583, 1958.
- LAYNE (D.J.), COMMON (R.H.), MAW (W.A.) et FRAPS (R.M.). — *Nature*, **181**, 351, 1958.
- LAYNE (D.S.) et MARRIAN (G.F.). — *Nature (Lond.)*, **182**, 50, 1958 a.
- LAYNE (D.S.) et MARRIAN (G.F.). — *Biochem. J.*, **70**, 244, 1958 b.
- LEBLOND (C.P.). — In *Ciba Found. Coll. on Endocrinology*, **2**, 150, 1952.
- LEDERER (E.). — *Chromatographie en chimie organique et biologique*. Masson, édit., Paris, 1959.
- LEHTINEN (A.), NURMIKKO (V.) et HARTIALA (J.W.). — *Acta Chem. Scand.*, **12**, 1585, 1958.
- LEVIN (L.). — *J. Biol. Chem.*, **158**, 725, 1945.
- LEVITZ (M.), CONDON (G.P.) et DANCIS (J.). — *Fed. Proc.*, **14**, 245, 1955.
- LEVITZ (M.), CONDON (G.P.) et DANCIS (J.). — *Endocrinology*, **58**, 376, 1956 a.
- LEVITZ (M.), CONDON (G.P.), MONEY (W.L.) et DANCIS (J.). — *J. Biol. Chem.*, **235**, 973, 1960.
- LEVITZ (M.), EMERMANS (S.), DANCIS (J.). — *Excepta Medica. International Congress Series*, Milan n° 51, Abstract n° 386, 1962.
- LEVITZ (M.) et SPITZER (J.R.). — *J. Biol. Chem.*, **222**, 979, 1956 c.
- LEVITZ (M.), SPITZER (J.R.) et TWOMBLY (G.H.). — *J. Biol. Chem.*, **222**, 981, 1956 b.
- LEVITZ (M.), SPITZER (J.R.) et TWOMBLY (G.H.). — *J. Biol. Chem.*, **231**, 787, 1958.
- LIEBERMAN (S.) et TEICH (S.). — *Pharmacol. Rev.*, **5**, 285, 1953.
- LISBOA (B.P.) et DICZFALUSY (E.). — *Acta Endocr. (Kbh)*, **40**, 60, 1962.
- LOKE (K.H.) et MARRIAN (G.F.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **27**, 213, 1958 a.
- LOKE (K.H.), MARRIAN (G.F.), JOHNSON (W.S.), MEYER (W.L.) et CAMERON (D.D.). — *Biochem. Biophys. Acta*, **28**, 214, 1958 b.
- LOKE (K.H.), MARRIAN (G.F.) et WATSON (E.J.D.). — *Biochem. J.*, **71**, 43, 1959.
- LOKE (K.H.), WATSON (E.J.D.) et MARRIAN (G.F.). — *Biochem. Biophys. Acta*, **26**, 230, 1957.
- LONGCHAMPT (J.E.). — *Exposés annuels de biochimie médicale*, 23<sup>e</sup> série. Masson, édit., 1961.
- LONGCHAMPT (J.E.), GUAL (C.), EHRENSTEIN (M.) et DORFMAN (R.I.). — *Endocrinology*, **66**, 416, 1960 a.
- LONGCHAMPT (J.E.), HAYANO (M.), EHRENSTEIN (M.) et DORFMAN (R.I.). — *Endocrinology*, **67**, 843, 1960 b.
- LORAIN (J.A.), MARRIAN (G.F.) et MACKAY (M.A.). (1957). — Cité par J.A. LORAIN in *Clinical application of hormone assay*. Livingstone, édit., 1958.
- LUISE (M.), MARESCOTTI (V.) et RIMOLDI (A.). — *Folia Endocr. (Roma)*, **15**, 667, 1962.
- LUPO (C.) et CHIEFFI (G.). — *Nature*, **197**, 596, 1963.
- MAC BRIDE (J.M.). — *J. Clin. Endocr.*, **17**, 1440, 1957.
- MAC CORQUODALE (D.W.), THAYER (S.A.) et DOISY (E.A.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.)*, **32**, 1182, 1935.

- MAC KENNA (J.), MENINI (E.) et NORZYMBERSKI (J.K.). — *Biochem. J.*, **79**, 11 p., 1961.
- MAC RAE (H.F.), ZAHARIA (W.) et COMMON (R.H.). — *Poultry Science*, **38**, 318, 1959 a.
- MAC RAE (H.F.), COMMON (R.H.) et LAYNE (D.S.). — *Poultry Science*, **38**, 684, 1959 b.
- MAC RAE (H.F.), COMMON (R.H.) et LAYNE (D.S.). — *Poultry Science*, **39**, 707, 1960 a.
- MAC RAE (H.F.), DALE (D.G.) et COMMON (R.H.). — *Canad. J. Bioch. and Physiol.*, **38**, 523, 1960 b.
- MADDOCK (W.O.) et NELSON (W.O.). — *J. Clin. Endocr.*, **12**, 985, 1952.
- MAHESH (V.B.), GREENBLATT (R.B.), AYDAR (C.K.), ROY (S.). — *Fertility and Sterility*, **13**, 513, 1962.
- MANER (F.D.), SAFFAN (B.D.), WIGGINS (R.A.), THOMPSON (J.D.) et PREEDY (J.R.K.). — *J. Clin. Endocr.*, **23**, 445, 1963.
- MARRIAN (G.F.). — *Biochem. J.*, **23**, 1090, 1929.
- MARRIAN (G.F.). — *Biochem. J.*, **24**, 435, 1930.
- MARRIAN (G.F.). — *Nature*, **154**, 19, 1944.
- MARRIAN (G.F.). — In *Progress in Endocrinology Part II*, 1961. Cambridge University Press.
- MARRIAN (G.F.) et BAULD (W.S.). — *Biochem. J.*, **58**, XXXVI, 1954.
- MARRIAN (G.F.) et BAULD (W.S.). — *Biochem. J.*, **59**, 136, 1955.
- MARRIAN (G.F.), LOKE (K.H.), WATSON (E.J.D.) et PANATTONI (M.). — *Biochem. J.*, **66**, 60, 1957 b.
- MARRIAN (G.F.), WATSON (E.J.D.) et PANATTONI (M.). — *Biochem. J.*, **65**, 12, 1957 a.
- MARTI (M.) et HEUSSER (A.). — *Helv. Chim. Acta*, **37**, 327, 1954.
- MARTIN (E.A.). — *Rev. Canad. Biol.*, **22**, 43, 1963.
- MENINI (E.) et DICZFALUSY (E.). — *Endocrinology*, **67**, 500, 1960.
- MERRILL (R.C.). — *Physiol. Rev.*, **38**, 463, 1958.
- MEYER (A.S.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **17**, 441, 1955.
- MIESCHER (K.). — *Helv. Chim. Acta*, **29**, 743, 1946.
- MIGEON (C.J.), BERTRAND (J.) et WALL (P.E.). — *J. Clin. Invest.*, **36**, 1315, 1957.
- MIGEON (C.J.), KELLER (A.R.) et HOLMSTROM (E.G.). — *Bull. John Hopkins Hosp.*, **97**, 415, 1955.
- MIGEON (C.J.), WALL (P.E.) et BERTRAND (J.). — *J. Clin. Invest.*, **38**, 619, 1959.
- MIKHAIL (G.), WIKVIST (N.) et DICZFALUSY (E.). — *Acta Endocrin. (Kbh)*, **42**, 519, 1963 a.
- MIKHAIL (G.), WIKVIST (N.) et DICZFALUSY (E.). — *Acta Endocrin. (Kbh)*, **43**, 213, 1963 b.
- DE MIQUEL (N.), ALONSO (C.) et TROËN (P.). — *Fed. Proceedings*, **22**, 330, 1963.
- MITCHELL (F.L.). — *Mémoires of the Soc. of Endocrinology*. Cambridge University Press, **3**, 63, 1955.
- MITCHELL (F.L.) et DAVIES (R.E.). — *Biochem. J.*, **56**, 690, 1954.
- MORACCI (E.). — *Arch. di Obstet. et Gynec.*, **54**, 44, 1949.
- MUELLER (G.C.) et RUMNEY (G.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, **79**, 1004, 1957.
- MÜHLBOCK (O.). — *Acta Brev. Neerl. Physiol.*, **10**, 1, 1940.
- NAKAO (T.) et AIZAWA (Y.). — *Endocrin. Japon*, **3**, 92, 1956.
- NAPP (J.H.). — *Habilitationsschrift*. Hamburg, 1954.
- NEHER (R.) et STARK (G.). — *Experientia*, **17**, 510, 1961.
- NISSER-MEYER (R.) et SANNER (T.). — *Acta Endocr. (Kbh)*. IV<sup>e</sup> Congrès Acta Endocr., suppl<sup>t</sup> **67**, 82, 1962.
- NOCKE (W.). — *Acta Endocr. (Kbh)*, suppl<sup>t</sup> **67**, IV<sup>e</sup> Congrès Acta Endocr., 83, 1962.
- NOCKE (W.), BREUER (H.) et KNUPPEN (R.). — *Acta Endocr. (Kbh)*, **36**, 393, 1961.
- ODELL (A.D.), SKILL (D.I.) et MARRIAN (G.F.). — *Pharm. (Lond.)*, **60**, 420, 1937.
- O'DONNELL (V.J.) et McCaig (J.G.). — *Biochem. J.*, **71**, 9 p., 1959.

- O'DONNELL (V.J.) et PREEDY (J.R.K.). — *In hormones in blood*; 303, Academic Press (London et New York), 1961.
- OERTEL (G.W.). — *Clinica Chimica Acta*, **6**, 237, 1961 a.
- OERTEL (G.W.). — *Klin. Wochenschr.*, **39**, 492, 1961 b.
- OERTEL (G.W.), WEST (C.D.) et EIK-NES (K.B.). — *J. Clin. Endocr.*, **19**, 1619, 1959.
- ONCLEY (J.L.) et GURD (F.R.N.). — *In Blood cells and plasma proteins*, New York Academic Press, p. 337, 1953.
- ONESON (I.B.) et COHEN (S.L.). — *Endocrinology*, **51**, 173, 1952.
- OUTOCHNIKOVA (N.S.) et SYTCH (L.D.). — *Akouch, i, Guinek*, **35**, 16, 1959.
- OVERBEEK (G.A.) et DE VISSER (J.). — *Acta Endocr. (Kbh)*, **28**, 459, 1958.
- PANIGEL (M.) et MAYER (M.). — *Comp. rend. seances Acad. Sci.*, **248**, 1031, 1959.
- PEARLMAN (W.H.). — *In Ciba Found. Coll. on Endocrinology*, **11**, 238, 1957.
- PEARLMAN (W.H.), CERCEO (E.) et THOMAS (M.). — *Fed. Proc.*, **13**, 272, 1954 a.
- PEARLMAN (W.H.) et DE MEIO (R.H.). — *J. Biol. Chem.*, **179**, 1141, 1949.
- PEARLMAN (W.H.), PEARLMAN (M.R.J.) et RAKOFF (A.E.). — *Am. J. Obst. Gynec.*, **66**, 370, 1953.
- PEARLMAN (W.H.), PEARLMAN (M.R.J.) et RAKOFF (A.E.). — *J. Biol. Chem.*, **209**, 803, 1954 b.
- PEARLMAN (W.H.) et PINCUS (G.). — *Fed. Proc.*, **5**, 79, 1946.
- PEARLMAN (W.H.), RAKOFF (A.E.), CANTAROW (A.) et PASCHKIS (K.E.). — *J. Biol. Chem.*, **170**, 173, 1947.
- PEARLMAN (W.H.), RAKOFF (A.E.), PASCHKIS (K.E.), CANTAROW (A.) et WALKING (A.A.). — *J. Biol. Chem.*, **173**, 175, 1948.
- PERON (F.G.). — *J. Biol. Chem.*, **236**, 1764, 1961.
- PINCUS (G.). — *Aspects du métabolisme des stéroïdes hormonaux*. Conférences. 1954. Masson, édit., Paris.
- PINCUS (G.) et ZAHL (P.A.). — *J. Gen. Physiol.*, **20**, 879, 1937.
- PLOTZ (E.J.) et DAVIS (F.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.)*, **95**, 92, 1957.
- PREEDY (J.R.K.) et AITKEN (E.H.). — *Lancet*, **1**, 191, 1957.
- PREEDY (J.R.K.) et AITKEN (E.H.). — *J. Biol. Chem.*, **236**, 1297, 1961 a.
- PREEDY (J.R.K.) et AITKEN (E.H.). — *J. Biol. Chem.*, **236**, 1300, 1961 b.
- PUCK (A.). — *Klin. Wschr.*, **33**, 865, 1955.
- PUCK (A.). — *Klin. Wschr.*, **35**, 808, 1957 a.
- PUCK (A.). — *Munch. Med. Wschr.*, **41**, 1505, 1957 b.
- PUCK (A.). — *Geburtsch. u. Frauenheilk.*, **18**, 998, 1958.
- PUCK (A.) et HUBNER (F.A.). — *Acta Endocr. (Kbh)*, **22**, 191, 1956.
- PUCK (A.) et KOMP (W.). — *Geburtsch. u. Frauenheilk.*, **20**, 132, 1960.
- PULKKINEN (M.O.). — *Acta Physiol. Scandinavica*, **52**, suppl<sup>1</sup> 180, 1961.
- PURDY (R.H.), ENGEL (L.L.) et ONCLEY (J.L.). — *Fed. Proc.*, **18**, 1208, 1959.
- PURDY (R.H.), ENGEL (L.L.) et ONCLEY (J.L.). — *J. Biol. Chem.*, **236**, 1043, 1961.
- RABINOWITZ (J.L.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 1295, 1955.
- RABINOWITZ (J.L.). — *Arch. Biochem.*, **64**, 285, 1956.
- RABINOWITZ (J.L.) et DOWBEN (R.M.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **16**, 96, 1955.
- RAKOFF (A.E.), PASCHKIS (K.E.) et CANTAROW (A.). — *Am. J. Obst. Gynecol.*, **46**, 856, 1943.
- REPKE (K.) et MARKWARDT (F.). — *Naturwissenschaften*, **41**, 258, 1954.
- RICARD (C.). — *Contribution à l'étude des ostrogènes dans le liquide des kystes folliculaires*. Thèse doctorat en médecine (dactyl.), Paris, 1962.
- ROBERTS (S.) et SZEGO (C.M.). — *Endocrinology*, **39**, 183, 1946.
- ROBERTS (S.) et SZEGO (C.M.). — *Ann. Rev. Biochem.*, **24**, 543, 1955.

- ROBEY (M.), CHOME (E.) et PIAUX (G.). — *Bull. Féd. Gynéc. et Obstétr. Franç.*, **13**, 125, 1961.
- ROMANOFF (E.B.) et PINCUS (G.). — *Endocrinology*, **71**, 752, 1962.
- ROY (E.J.). — *J. Obst. Gynaec. Brit. Commonw.*, **66**, 196, 1962 a.
- ROY (E.J.). — *J. Endocrin. (G.-B.)*, **25**, 361, 1962 b.
- ROY (E.J.) et BROWN (J.B.). — Cité par J.A. LORAIN in : *Ciba Found. Coll. on Endocrinology*, **11**, 335, 1957.
- ROY (E.J.) et BROWN (J.B.). — *J. Endocrin.*, **21**, 9, 1960.
- ROY (E.J.) et MACKAY (R.). — *J. Obstet. Gynaec. Brit. Commonw.*, **69**, 13, 1962.
- ROY (E.J.), HARKNESS (R.A.) et KERR (M.G.). — *J. Obstet. Gynaec. Brit. Commonw.*, **70**, 597, 1963.
- RYAN (K.J.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **27**, 658, 1958.
- RYAN (K.J.). — *J. Biol. Chem.*, **234**, 268, 1959 a.
- RYAN (K.J.). — *J. Biol. Chem.*, **234**, 2006, 1959 b.
- RYAN (K.J.) et ENGEL (L.L.). — *Endocrinology*, **52**, 277, 1953 a.
- RYAN (K.J.) et ENGEL (L.L.). — *Endocrinology*, **52**, 287, 1953 b.
- RYAN (K.J.) et ENGEL (L.L.). — *Endocrinology*, **59**, 499, 1956.
- RYAN (K.J.) et SMITH (O.W.). — *J. Biol. Chem.*, **236**, 705, 1961 a.
- RYAN (K.J.) et SMITH (O.W.). — *J. Biol. Chem.*, **236**, 710, 1961 b.
- RYAN (K.J.) et SMITH (O.W.). — *J. Biol. Chem.*, **236**, 2204, 1961 c.
- RYAN (K.J.) et SMITH (O.W.). — *J. Biol. Chem.*, **236**, 2207, 1961 d.
- SAFFRAN (B.D.), BROWN (C.H.) et PREEDY (J.R.K.). — *J. Clin. Research*, **8**, 246, 1960.
- SALHANICK (H.A.) et BERLINER (D.L.). — *J. Biol. Chem.*, **227**, 583, 1957.
- SANDBERG (A.A.) et SLAUNWHITE (W.R. Jr.). — *J. Clin. Invest.*, **36**, 1266, 1957.
- SANDBERG (A.A.), SLAUNWHITE (W.R. Jr.) et ANTONIADES (H.N.). — *Rec. Prog. Hormone Res.*, **13**, 209, 1957.
- SANDBERG (A.A.), SLAUNWHITE (W.R. Jr.) et ANTONIADES (H.N.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **106**, 831, 1961.
- SANDBERG (H.), PAULSEN (C.A.), LEACH (R.B.) et MADDOCK (W.O.). — *J. Clin. Endocr.*, **18**, 1268, 1958.
- SANTARELLI (J.). — *A propos du dosage des œstrogènes dans 71 muqueuses utérines*. Thèse doctorat en médecine (dactyl.), Paris, 1963.
- SAVARD (K.), MARSH (J.M.) et HOWELL (D.S.). — *Endocrinology*, **73**, 554, 1963.
- SCHACHTER (B.) et MARRIAN (G.F.). — *J. Biol. Chem.*, **126**, 663, 1938.
- SCHACHTER (B.), KASS (D.J.) et LANNON (J.J.). — *J. Biol. Chem.*, **234**, 201, 1959.
- SCHILD (W.). — *Zeitsch. für die gesamte experimentelle Medizin*, **135**, 1, 1961.
- SCHILLER (J.) et PINCUS (G.). — *Archives of Biochemistry*, **2**, 317, 1943.
- SCHMIDT-ELMENDORFF (H.W.). — *Acta Endocr. (Kbh)*, **38**, 527, 1961.
- SCHWERDTFEGER (H.). — *Arch. f. exp. Path. und Pharm.*, **163**, 487, 1932.
- SCHWERS (J.). — *Les œstrogènes au cours de la deuxième moitié de la grossesse*. Arcsia, éd. Bruxelles, 1964.
- SEGALOFF (A.). — *Endocrinology*, **40**, 44, 1947.
- SERCHI (G.). — *Chimie Biochim.*, **8**, 10, 1953.
- SHORT (R.V.). — *J. Endocr. (G.B.)*, **20**, 147, 1960.
- SHORT (R.V.). — *J. Endocr. (G.-B.)*, **22**, 153, 1961.
- SHORT (R.V.). — *J. Endocr. (G.-B.)*, **23**, 401, 1962.
- SHORT (R.V.) et LONDON (D.R.). — *Brit. Med. J.*, **5241**, 1724, 1961.
- SIE (H.G.) et FISHMANN (W.H.). — *J. Biol. Chem.*, **225**, 453, 1957.
- SIH (C.J.). — *Biochem. and Biophys. Res. Communication*, **7**, 87, 1962.
- SITERI (P.K.) et MAC DONALD (P.C.). — *Steroids*, **2**, 713, 1963.

- SIMPSON (S.L.) et JOLL (C.A.). — *Endocrinology*, **22**, 595, 1938.
- SIMPSON (T.H.), WRIGHT (R.S.) et HUNT (S.V.). — *J. Endocrin.* (G.-B.), **26**, 499, 1963.
- SLAUNWHITE (W.R. Jr.) et BUCHWALD (K.W.). — *J. Clin. Endocr.*, **20**, 786, 1960.
- SLAUNWHITE (W.R. Jr.) et SANDBERG (A.A.). — *Arch. Biochem.*, **63**, 478, 1956.
- SLAUNWHITE (W.R. Jr.) et SANDBERG (A.A.). — *Proc. Soc. Exp. Biol.*, **101**, 544, 1959.
- SMITH (G.V.) et SMITH (O.W.). — *Am. J. Obst. and Gynec.*, **36**, 769, 1938.
- SMITH (G.V.) et SMITH (O.W.). — *Recent Prog. Hormone Res.*, **7**, 209, 1952.
- SMITH (G.V.), SMITH (O.W.), HUFFMAN (M.N.), THAYER (S.A.), MC CORQUODALE (D.W.) et DOISY (E.A.). — *J. Biol. Chem.*, **130**, 431, 1939.
- SMITH (G.V.), SMITH (O.W.) et SCHILLER (S.). — *Am. J. Obst. Gyn.*, **44**, 606, 1942.
- SMITH (O.W.). — *Endocrinology*, **67**, 698, 1960.
- SMITH (O.W.) et ARAI (K.). — *J. Clin. Endocr.*, **23**, 1141, 1963.
- SMITH (O.W.) et RYAN (K.J.). — *Endocrinology*, **69**, 970, 1961.
- SMITH (O.W.) et RYAN (K.J.). — *Am. J. Obst. et Gynecol.*, **84**, 141, 1962.
- SNEDDON (A.) et MARRIAN (G.F.). — *Biochem. J.*, **86**, 385, 1963.
- SNEDECOR (G.W.). — *Biometrics*, **8**, 85, Question 92, 1952.
- STAKEMANN (G.) et FRANDSEN (U.A.). — *Acta Endocr.* (Kbh), suppl<sup>t</sup> **67**, IV<sup>e</sup> Congrès Acta Endocr., 116, 1962.
- STEIDLE (H.). — *Arch. f. Exp. Path. und Pharm.*, **157**, 89, 1930.
- STEINACH (E.) et KUN (H.). — *Lancet*, **233**, 845, 1937.
- STEWART (H.J. Jr.). — *Amer. J. Obst. Gynec.*, **61**, 990, 1951.
- STIMMEL (B.F.), GROLLMAN (A.) et HUFMAN (M.N.). — *J. Biol. Chem.*, **176**, 461, 1948.
- STIMMEL (B.F.) et MAY (J.A.). — *J. Clin. Endocr.*, **13**, 874, 1953.
- STIMMEL (B.F.) et STEALY (C.L.). — *J. Clin. Endocr.*, **12**, 489, 1952.
- STONE (G.M.), BAGGETT (B.) et DONNELLY (R.B.). — *J. Endocrinol.* (G.-B.), **27**, 271, 1963.
- STROMINGER (J.L.), KALCKAR (H.M.), AXELROD (J.) et MAXWELL (E.S.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, **76**, 6411, 1954.
- STROUD (S.W.). — *J. Endocrinol.* (G.-B.), **1**, 201, 1939.
- SUAREZ-SOTO (M.) et LEGAULT-DÉMARE (J.). — *Acta Endocr.* (Kbh), **33**, 444, 1960.
- SVENDSEN (R.). — *Acta Endocr.* (Kbh), **35**, 161, 1960.
- TALALAY (P.) et WILLIAMS-ASHMAN (H.G.). — *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **44**, 15, 1958.
- TEN BERGE (B.S.). — *Gynaecologia* (Bâle), **149**, 40, 1960.
- TOUCHSTONE (J.C.) et GREENE (J.W.). — *J. Clin. Endocr.*, **20**, 647, 1960.
- TOUCHSTONE (J.C.), GREENE (J.W.), MC ELROY (R.C.) et MURAWEC (T.). — *Biochemistry*, **2**, 653, 1963.
- TOUCHSTONE (J.C.) et MURAWEC (T.). — *Fed. Proceed*, **22**, 469, 1963.
- TROËN (P.). — In : *Rec. Progr. in the Endocrinology of reproduction*. Académie Press, N.Y., 1959.
- TROËN (P.). — *J. Clin. Endocr.*, **21**, 895, 1961.
- TROËN (P.), NILSSON (B.), WIKVIST (N.) et DICZFALUSY (E.). — *Acta Endocr.* (Kbh), **38**, 361, 1961.
- ULLBERG (S.) et BENGSSON (G.). — *Acta Endocr.* (Kbh), **43**, 75, 1963.
- VARANGOT (J.) et CEDARD (L.). — *C.R. séances Soc. Biologie*, **151**, 1673, 1957 a.
- VARANGOT (J.) et CEDARD (L.). — *C.R. séances Soc. Biologie*, **151**, 1707, 1957 b.
- VARANGOT (J.) et CEDARD (L.). — *C.R. séances Soc. Biologie*, **151**, 2032, 1957 c.
- VARANGOT (J.) et CEDARD (L.). — *C.R. séances Soc. Biol.*, **153**, 1701, 1959.
- VARANGOT (J.), CEDARD (L.) et YANNOTTI (S.). — *Excerpta Medica International Congress*, series n° 51, Abstract n° 396, Milan, 1962.
- VARANGOT (J.), SEEMAN (A.) et CEDARD (L.). — *Sem. Hôp. Paris*, 31<sup>e</sup> année, n° 18/2, 1955.

- VARANGOT (J.) et THOMAS (J.A.). — *Compt. rend. Acad. Sciences*, **228**, 132, 1949.
- VELDHUIS (A.H.). — *J. Biol. Chem.*, **202**, 107, 1953.
- VELLE (W.). — *Acta Endocr. (Kbh)*, **28**, 186, 1958.
- VELLE (W.) et ERICHSEN (S.). — *Acta Endocr. (Kbh)*, **33**, 277, 1960.
- VILLEE (C.A.). — *J. Biol. Chem.*, **205**, 113, 1953.
- VILLEE (C.A.). — *J. Biol. Chem.*, **215**, 171, 1955.
- VILLEE (C.A.). — *Amer. J. Obst. Gynecol.*, **84**, 1684, 1962.
- VILLEE (C.A.), HAGERMAN (D.D.) et JOEL (P.B.). — *Rec. Progr. in Hormone Res.*, **16**, 49, 1960.
- VILLEE (D.B.), DIMOLINE (A.), ENGEL (L.L.), VILLEE (C.A.) et RAKER (J.). — *J. Clin. Endocrin.*, **22**, 726, 1962.
- VILLEE (D.B.), ENGEL (L.L.), LORING (J.M.) et VILLEE (C.A.). — *Endocrinology*, **69**, 354, 1961.
- VINSON (G.P.), NORBYMERSKI (J.K.) et CHESTER-JONES (I.). — *J. Endocrinol. (G.-B.)*, **25**, 557, 1963.
- WALL (P.E.) et MIGEON (C.J.). — *J. Clin. Invest.*, **38**, 611, 1959.
- WARD (P.J.) et GRANT (J.K.). — *Biochem. J.*, **84**, « *Proc. of the Biochem. Soc.* », 117 p., 1962.
- WARREN (J.C.) et SALHANICK (H.A.). — *J. Clin. Endocrin.*, **21**, 7376, 1961.
- WARREN (J.C.) et TIMBERLAKE (C.E.). — *J. Clin. Endocrin.*, **22**, 1148, 1962.
- WATSON (E.J.D.) et MARRIAN (G.F.). — *Biochem. J.*, **63**, 64, 1956.
- WELIKY (I.) et ENGEL (L.L.). — *J. Biol. Chem.*, **238**, 1302, 1963.
- WERBIN (H.), PLOTZ (J.), LE ROY (G.V.) et DAVIS (E.M.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, **79**, 1012, 1957.
- WERTHESSEN (N.T.), SCHWENK (E.) et BAKER (C.F.). — *Science*, **117**, 380, 1953.
- WEST (C.D.), DAMAST (B.L.), SARRO (S.D.) et PEARSON (O.H.). — *J. Biol. Chem.*, **218**, 409, 1956.
- WESTERFELD (W.W.), MC CORQUODALE (D.W.), THAYER (S.A.) et DOISY (E.A.). — *J. Biol. Chem.*, **126**, 195, 1938.
- WILSON (R.), ERIKSSON (G.) et DICZFALUSY (E.). — *Acta Endocr. (Kbh)*, **46**, 525, 1964.
- WOTIZ (H.H.), BOTICELLI (C.R.), HISAW (F.L. Jr.) et OLSEN (A.G.). — *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **46**, 580, 1960.
- WOTIZ (H.H.), BOTICELLI (C.R.), HISAW (F.L. Jr.) et RINGLER (J.). — *J. Biol. Chem.*, **231**, 589, 1958.
- WOTIZ (H.H.), DAVIS (J.W.) et LEMON (H.M.). — *J. Biol. Chem.*, **216**, 677, 1955 a.
- WOTIZ (H.H.), DAVIS (J.W.), LEMON (H.M.) et GUT (M.). — *J. Biol. Chem.*, **222**, 487, 1955 b.
- WOTIZ (H.H.) et LEMON (H.M.). — *Extraits du IV<sup>e</sup> Congrès International de Biochimie* (Vienne, 1958), dans : *Biochemistry of steroids*. London, Pergamon Press, 1959.
- WOTIZ (H.H.) et MARTIN (H.F.). — *J. Biol. Chem.*, **236**, 1312, 1961.
- ZANDER (J.), BRENTLE (E.), MUNSTERMANN (A.M.), DICZFALUSY (E.), MARTINSEN (B.) et TILLINGER (K.G.). — *Acta Obstet. Gynec. Scand.*, **38**, 724, 1959.
- ZANDER (J.), THIJSSSEN (J.) et MUNSTERMANN (A.M.). — *J. Clin. Endocrin.*, **22**, 861, 1962.
- ZONDEK (B.) et ASCHEIM (S.). — *Arch. Gynäk.*, **130**, 1, 1927.



# TABLE DES MATIÈRES

|                               |     |
|-------------------------------|-----|
| PRÉFACE, par J. VARANGOT..... | VII |
| AVANT-PROPOS .....            | 1   |
| INTRODUCTION .....            | 3   |

## *Première partie*

### *Brève revue de la biosynthèse et du métabolisme des œstrogènes dans l'espèce humaine*

|                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| I. — <i>Isolement et structure chimique des œstrogènes naturels</i> .....       | 7  |
| Œstrogènes classiques .....                                                     | 11 |
| Nouveaux œstrogènes .....                                                       | 13 |
| II. — <i>Lieu de formation des œstrogènes dans l'espèce humaine</i> .....       | 15 |
| L'ovaire .....                                                                  | 15 |
| Le placenta .....                                                               | 16 |
| Le cortex surrénal .....                                                        | 17 |
| Le testicule .....                                                              | 17 |
| III. — <i>Biogénèse des œstrogènes naturels</i> .....                           | 18 |
| IV. — <i>Métabolisme intermédiaire in vivo et in vitro</i> .....                | 22 |
| V. — <i>Conjugaison des œstrogènes aux acides sulfurique et glucuronique</i> .. | 31 |
| Nature et mode de formation des œstrogènes conjugués .....                      | 31 |
| Lieux de formation .....                                                        | 33 |
| Conclusion .....                                                                | 37 |
| VI. — <i>Formes de transport et distribution dans l'organisme</i> .....         | 38 |
| Formes de transport .....                                                       | 38 |
| Distribution dans l'organisme et destin métabolique .....                       | 40 |
| Conclusion .....                                                                | 42 |

## *Deuxième partie*

### *Dosage des œstrogènes dans le sang et les tissus humains*

|                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Chapitre premier. — MATÉRIEL ET MÉTHODES</i> .....                   | 43 |
| I. — <i>Mise au point d'une technique des œstrogènes sanguins</i> ..... | 43 |
| Intérêt de la mesure des œstrogènes sanguins .....                      | 43 |

|                                                                                                                       |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Difficultés et choix d'une technique de dosage .....                                                                  | 44  |
| Les méthodes biologiques .....                                                                                        | 45  |
| Les méthodes chimiques .....                                                                                          | 45  |
| Méthode employée .....                                                                                                | 49  |
| Vérifications techniques .....                                                                                        | 57  |
| Dosage des œstrogènes urinaires .....                                                                                 | 65  |
| II. — <i>Dosage des œstrogènes dans les tissus humains</i> .....                                                      | 65  |
| Technique .....                                                                                                       | 66  |
| Chapitre II. — RÉSULTATS .....                                                                                        | 69  |
| I. — <i>Variations des œstrogènes sanguins au cours de certains états physiologiques</i> .....                        | 69  |
| Grossesse normale .....                                                                                               | 69  |
| Cycle menstruel .....                                                                                                 | 76  |
| Ménopause. Hommes. Aménorrhée .....                                                                                   | 79  |
| II. — <i>Influence de quelques états pathologiques sur les œstrogènes sanguins.</i> .....                             | 80  |
| Stérilités féminines .....                                                                                            | 80  |
| Fibromes utérins .....                                                                                                | 85  |
| Conclusion .....                                                                                                      | 87  |
| III. — <i>Dosage des œstrogènes dans les liquides organiques prélevé au cours d'interventions chirurgicales</i> ..... | 88  |
| Dosage dans le sang de la veine ovarienne .....                                                                       | 88  |
| Dosage des œstrogènes dans le liquide de kystes folliculaires ..                                                      | 92  |
| Résumé .....                                                                                                          | 97  |
| IV. — <i>Dosage des œstrogènes sanguins au cours de quelques recherches expérimentales</i> .....                      | 97  |
| Influence de la progestérone sur le métabolisme des œstrogènes. ..                                                    | 98  |
| Rôle de l'utérus et plus précisément de l'endomètre dans le métabolisme des œstrogènes .....                          | 100 |
| Conclusion et rôle biologique de l'œstriol .....                                                                      | 103 |
| V. — <i>Dosage des œstrogènes dans les tissus humains</i> .....                                                       | 104 |
| Dosage des œstrogènes dans les ovaires entiers .....                                                                  | 106 |
| Dosage des œstrogènes dans les corps jaunes .....                                                                     | 109 |
| Dosage des œstrogènes dans le muscle utérin et dans les fibromyomes .....                                             | 113 |
| Dosage des œstrogènes dans la muqueuse utérine .....                                                                  | 115 |
| Conclusion .....                                                                                                      | 121 |
| Chapitre III. — EXPÉRIENCES EFFECTUÉES IN VITRO AVEC DES FRAGMENTS D'ENDOMÈTRE ET UN UTÉRUS ENTIER .....              | 124 |
| I. — <i>Incubation de tranches de muqueuse utérine</i> .....                                                          | 124 |
| II. — <i>Incubation d'homogénats de muqueuse utérine</i> .....                                                        | 125 |
| III. — <i>Perfusion d'un utérus entier</i> .....                                                                      | 126 |
| Conclusion .....                                                                                                      | 132 |

*Troisième partie****Perfusion de placenta humain in vitro  
appliquée à l'étude de la biosynthèse des œstrogènes***

|      |                                                                                                              |     |
|------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| I. — | <i>Introduction</i> .....                                                                                    | 135 |
| II.  | <i>Matériel et méthodes</i> .....                                                                            | 137 |
|      | Technique de perfusion .....                                                                                 | 137 |
|      | Méthodes de dosage et vérifications techniques .....                                                         | 140 |
| III. | <i>Résultats</i> .....                                                                                       | 144 |
|      | Libération d'œstrogènes dans le liquide de perfusion.....                                                    | 144 |
|      | Interconversion des œstrogènes .....                                                                         | 146 |
|      | Biosynthèse de l'œstriol à partir de stéroïdes hydroxyles sur le<br>carbone 16 .....                         | 150 |
|      | Biosynthèse des œstrogènes à partir de stéroïdes à 18 ou 19 atomes<br>de carbone neutres ou substitués ..... | 155 |
|      | Influence des gonadotrophines chorioniques .....                                                             | 163 |
| IV.  | <i>Conclusion</i> .....                                                                                      | 167 |

*Quatrième partie****Les vertébrés inférieurs et les invertébrés***

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| œstrogènes chez les vertébrés inférieurs et les invertébrés ..... | 171 |
| Introduction .....                                                | 171 |
| Historique .....                                                  | 171 |
| Travaux personnels .....                                          | 174 |
| Conclusion .....                                                  | 182 |
| <i>Conclusion générale</i> .....                                  | 183 |
| <i>Résumé</i> .....                                               | 184 |
| <i>Bibliographie</i> .....                                        | 188 |

## DEUXIÈME THÈSE

---

Propositions données par la Faculté

DONNÉES RÉCENTES  
SUR L'ACTION DES STÉROÏDES HORMONAUX  
VIS-A-VIS  
DE RÉACTIONS ENZYMATIQUES SPÉCIFIQUES ;  
IMPORTANCE DE CES ACTIONS  
POUR L'EXPLICATION DES EFFETS HORMONAUX

Vu et approuvé :

*Paris, le 17 avril 1964*

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

Marc ZAMANSKY

Vu

et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie  
de Paris.

Jean ROCHE

MASSON ET C<sup>ie</sup>, ÉDITEURS

120, boul. Saint-Germain, Paris (VI<sup>e</sup>)

Dépôt légal : 1<sup>er</sup> trimestre 1964

Imprimerie l'Union Typographique  
Villeneuve-Saint-Georges (S.-et-O.).

N<sup>o</sup> d'édition : 218-64









